

Warszawa, 26.07.2023

dr hab. inż. Renata Toczyłowska-Mamińska, prof. SGGW

Szkoła Główna
Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Biologii
Katedra Fizyki i Biofizyki

ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa
+48 22 59 38611
kfb@sggw.edu.pl
www.sggw.edu.pl
kf.sggw.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Edyty Maroń p.t. :
„Magnetoliposomy jako kontrolowany magnetycznie system dostarczania
leków przeciwnowotworowych do komórek w hodowlach *in vitro*”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana pod kierunkiem prof. dr hab. Michała Chudego z Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej i prof. dr hab. Pawła Krysińskiego z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, w ramach interdyscyplinarnych studiów doktoranckich „Od chemii do bioinnowacji” TRI-BIO-CHEM. Praca liczy 170 stron i zawiera wszystkie przewidziane ustawą elementy, z podziałem na część literaturową (57 stron) i część doświadczalną (95 stron) obejmującą metodykę badań, opis uzyskanych wyników doświadczeń oraz ich dyskusję. W części zatytułowanej „Dorobek naukowy” przedstawiony został spis publikacji Doktorantki, który obejmuje 4 publikacje w czasopismach z listy JCR oraz 5 wystąpień na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Spis literatury obejmuje 196 pozycji adekwatnych tematycznie, stanowiących głównie odniesienia do artykułów z czasopism z listy JCR z ostatnich lat.

Pani mgr inż. Edyta Maroń podjęła się badania bardzo istotnej i złożonej tematyki celowanej terapii nowotworów, która stanowi odpowiedź na niekorzystne oddziaływanie leków

przeciwnowotworowych na zdrowe komórki organizmu. Cel pracy jest ambitny, dobrze sformułowany i konsekwentnie zrealizowany. Mimo tego, że klinicznie dostępnych jest już wiele leków przeciwnowotworowych, skuteczność ich dawki terapeutycznej jest ograniczona, ze względu na silne działania niepożądane i brak specyficzności tkankowej. Cytotoksyczność leków przeciwnowotworowych dotyczy nie tylko komórek nowotworowych, ale także szybko dzielących się komórek prawidłowych, np. szpiku, przewodu pokarmowego czy mieszków włosowych. Dobrym tego przykładem jest bardzo popularny w badaniach oraz klinicznie chemioterapeutyk – doksorubicyna - antybiotyk antracyklinowy wbudowujący się w DNA, prowadząc do jego rozpadu i skutecznego zahamowania proliferacji komórek nowotworowych. Chociaż aktywność przeciwnowotworowa doksorubicyny jest wysoka, jej stosowanie prowadzi do licznych działań niepożądanych, związanych z oddziaływaniem leku także na zdrowe komórki organizmu np. kardiomiopatii, neutropenii, niedokrwistości czy martwicy narządów. Rozwiązaniem tego problemu są nośniki leków, które są w stanie utrzymywać lek w swoich strukturach, dostarczyć go do tkanki nowotworowej, a następnie uwolnić lek w kontrolowany sposób, ograniczając tym samym kontakt wolnego leku ze zdrowymi komórkami organizmu i kierując go bezpośrednio do guza. W swojej pracy Doktorantka wykorzystała magnetoliposomy jako nośniki zdolne do selektywnej akumulacji w komórkach nowotworowych za pomocą stałego pola magnetycznego i kontrolowanego uwalniania leku na skutek mechanicznego rozerwania dwuwarstwy lipidowej liposomu za pomocą zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości.

Rozprawa rozpoczyna się streszczeniem w języku polskim i angielskim, po którym pojawia się wprowadzenie, w którym Doktorantka uzasadnia podjęcie tematyki doktoratu oraz przedstawia cele badawcze. W części literaturowej Autorka w przejrzysty sposób przedstawiła liposomy jako narzędzie terapii antynowotworowej. Opisano budowę liposomów, sposób ich wytwarzania oraz zasady projektowania liposomów i sposoby dostarczania leków do tkanek nowotworowych za ich pomocą. Następnie, po wprowadzeniu w zagadnienie własności magnetycznych materiałów, opisano nanocząstki magnetyczne – m.in. ich właściwości, sposoby wytwarzania i modyfikacji oraz scharakteryzowano magnetoliposomy jako połączenie liposomów z nanocząstkami magnetycznymi. Część literaturową pracy kończy omówienie mikrosystemów przepływowych jako narzędzi do badań *in vitro* pod kątem opracowania terapii antynowotworowych. Przegląd literaturowy oparty jest głównie na doniesieniach z ostatnich 5-10 lat, co świadczy o aktualności

podjętej przez Panią magister tematyki badawczej. Ponadto, sposób i szczegółowość opisu przedstawionych zagadnień wskazuje na dogłębną analizę i zrozumienie tematu przez Doktorantkę.

Głównym celem rozprawy było opracowanie systemu dostarczania i uwalniania leków przeciwnowotworowych z wykorzystaniem magnetoliposomów. Część doświadczalną rozpoczyna przedstawienie szczegółowych tez i celów pracy. Hipotezy zakładały (1) otrzymanie magnetoliposomów przez wbudowanie nanocząstek magnetycznych do dwuwarstwy lipidowej liposomów, (2) wykorzystanie magnetoliposomów jako nośników zamkniętych w ich wnętrzu leków przeciwnowotworowych, (3) wykorzystanie stałego pola magnetycznego do aktywnego dostarczania leków oraz zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości do uwalniania leków z magnetoliposomów, a także (4) zastosowanie mikrosystemów przepływowych jako układów do oceny skuteczności dostarczania leków za pomocą magnetoliposomów do komórek hodowanych w postaci sferoidów, będących trójwymiarowym modelem guza nowotworowego. W części „Materiały i metodyka badań” przedstawiony został obszerny opis syntezy nanocząstek magnetycznych i magnetoliposomów, wykonania mikroukładu przepływowego oraz zastosowanej metodyki badań. Na podkreślenie zasługuje wykorzystanie przez Doktorantkę szerokiego wachlarza metod badawczych: transmisyjnej mikroskopii elektronowej do analizy morfologii nanocząstek, analizy termogravimetrycznej do określenia stabilności termicznej nanocząstek magnetycznych, analizy fizykochemicznej otrzymanych nanocząstek za pomocą dynamicznego rozpraszania światła, magnetometrii wibracyjnej do określenia własności magnetycznych czy spektrofлуorymetrii do pomiaru stężenia uwalnianej z magnetoliposomów doksorubicyny. Praca obejmowała też szereg badań na liniach komórkowych prawidłowej i nowotworowej, t.j. analizę aktywności metabolicznej komórek w celu oznaczenia aktywności cytotoksycznej chemioterapeutyków – test MTT i test dehydrogenazy mleczanowej LDH, różne rodzaje barwienia różnicowego w skojarzeniu z mikroskopią konfokalną w celu określenia żywotności komórek i przydatności magnetoliposomów do efektywnego transportu leku, pomiarów fluorescencyjnych czy cytometrii przepływowej np. do określenia typu śmierci komórkowej i skuteczności wnikania magnetoliposomów z lekiem do komórek.

Badania w ramach niniejszej pracy Doktorantka rozpoczęła od charakterystyki fizykochemicznej otrzymanych superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza. Wykazano, że średnica otrzymanych cząstek magnetycznych mieściła się w przedziale 5-12 nm, przy średniej

wielkości 8-9 nm, co umożliwia ich planowane zastosowanie w magnetoliposomach. Cząstki charakteryzowała także niska koercja i szybkie nasycenie namagnesowania w obecności zewnętrznego pola magnetycznego o niskim natężeniu, co potwierdziło ich superparamagnetyczne właściwości. Następnie zbadano wielkość otrzymanych liposomów oraz magnetoliposomów i stwierdzono, że rozkład wielkości nośników był wąski oraz potwierdzono ich właściwy rozmiar, odpowiedni do akumulacji w guzie nowotworowym. Stwierdzono, że otrzymane pęcherzyki były stabilne w badanym okresie czasu, a wprowadzenie dokсорubicyny nie wpływa istotnie na ich rozmiar i kształt. Wydajność enkapsulacji leku w liposomach i magnetoliposomach wyniosła około 40%, a potencjał zeta wyniósł od -1.4 do -2.1 mV, co wskazuje na dobrą stabilność koloidalną otrzymanych nośników. Wbudowanie hydrofobowych magnetycznych nanocząstek w dwuwarstwę lipidową liposomu potwierdzono metodami obrazowania, a ich stosunek masowy do lipidów tworzących magnetoliposomy wyniósł 5%, co potwierdzono jako wystarczający do zapewnienia ruchu magnetoliposomów w polu magnetycznym.

Następnym krokiem było zbadanie przez Autorkę stabilności magnetoliposomów enkapsulowanych dokсорubicyną - sprawdzono bierne uwalnianie leku w temperaturze fizjologicznej i zmiennym pH oraz pod wpływem temperatury w zakresie 30 – 50°C. Stwierdzono, że otrzymane magnetoliposomy są stabilne w warunkach fizjologicznych, a lek jest dobrze utrzymywany w ich wnętrzu. Uwalnianie dokсорubicyny z nośników następowało dopiero w temperaturze powyżej 43°C. Przeprowadzono również badania kontrolowanego za pomocą bodźca magnetycznego uwalniania leku z nośnika. Zastosowanie zmiennego pola magnetycznego o częstotliwości 50 kHz spowodowało uwalnianie leku z magnetoliposomów na skutek ich mechanicznego rozpadu zainicjowanego drganiem nanocząstek żelaza w tym polu. Zastosowanie przez Doktorantkę półempirycznego modelu Korsmeyera-Peppasa potwierdziło, że po degradacji membrany magnetoliposomów dokсорubicyna jest uwalniana na drodze dyfuzji przez swobodny wypływ z wnętrza nośnika. Zaproponowany w ramach niniejszej pracy sposób mechanicznej degradacji magnetoliposomów za pomocą pola magnetycznego niskiej częstotliwości jest korzystniejszy z punktu widzenia klinicznego niż mechanizm uwalniania z wykorzystaniem hipertermii magnetycznej w polu o wysokiej częstotliwości, zwykle stosowany. Pozwala to na złagodzenie niekontrolowanego wzrostu ciepła podczas uwalniania leków, co stanowi ograniczenie zastosowania terapii magnetotermicznej.

Kolejnym etapem było przeprowadzenie przez Autorkę badań cytotoksyczności opracowanych nanocząstek na ludzkich liniach komórkowych prawidłowej oraz nowotworowej piersi. Określono, że zarówno nanocząstki magnetyczne, magnetoliposomy jak i liposomy z dokсорubicyną oraz bez są biokompatybilne i nie wpływają na żywotność badanych komórek. Efekt cytotoksyczny w reakcji na bodziec magnetyczny obserwowany jest jedynie w przypadku magnetoliposomów z dokсорubicyną, w przypadku których żywotność komórek nowotworowych spadła do 20%, a żywotność komórek prawidłowych utrzymywała się na wysokim poziomie (powyżej 70%). Tym samym zaproponowane w pracy nośniki mają cechy potrzebne do celowanej terapii antynowotworowej, umożliwiające dostarczanie leku i jego uwalnianie w sposób kontrolowany, nie wywierając negatywnego efektu na zdrowe komórki. Pani mgr inż. Edyta Maroń w ramach swojej pracy doktorskiej przeprowadziła także badania optymalizacji parametrów pola magnetycznego pod kątem magnetoterapii w celu uzyskania maksymalnego efektu cytotoksycznego. Badano wpływ wielkości indukcji magnetycznej, częstotliwości zmiennego pola magnetycznego i profilu napięcia zasilającego na żywotność komórek, do których wprowadzono magnetoliposomy z dokсорubicyną. Stwierdzono, że różnice w żywotności komórkowej występowały jedynie w przypadku zmiennych wartości indukcji magnetycznej. Najwyższy efekt cytotoksyczny zaobserwowano dla najwyższej badanej wartości indukcji, t.j. 8.7 mT. Zmiana pozostałych parametrów nie wpłynęła na efektywność degradacji magnetoliposomów i uwalniania z nich leku.

Bardzo ciekawym aspektem badawczym podjętym przez Doktorantkę w ramach pracy było określenie typu śmierci komórkowej (apoptotycznej lub nekrotycznej) na skutek magnetoterapii przeprowadzonej z udziałem opracowanych magnetoliposomów. Potwierdzono, że dominującym typem śmierci komórkowej jest apoptoza, która jest najbardziej pożądanym mechanizmem. Podczas nekrozy następuje niekontrolowane wydostanie się zawartości komórki do otaczającej przestrzeni na skutek dezintegracji błony komórkowej, co skutkuje indukcją stanu zapalnego w organizmie. Tymczasem apoptoza jest procesem uporządkowanym, podczas którego treść komórkowa zamykana jest w ciałkach apoptotycznych trawionych następnie przez makrofagi, co zapobiega rozwojowi reakcji zapalnej. Zbadano również, że podczas magnetoterapii dokсорubicyna przerywa integralność błon komórkowych i wnika do jąder znacznie skuteczniej w przypadku komórek nowotworowych niż zdrowych, co może stanowić przyczynę zwiększonej wrażliwości tych

komórek na lek. Selektywność doksorubicyny uwalnianej z magnetoliposomów względem komórek nowotworowych potwierdzono także w badaniach cytotoksyczności pod wpływem stałego pola magnetycznego przykładanego w celu nakierowania magnetoliposomów, co wskazuje na możliwość skoncentrowania terapii na tkance nowotworowej, z oszczędzeniem tkanek prawidłowych.

Ostatnia część badań przeprowadzonych w ramach doktoratu przez Panią mgr inż. Edytę Maroń wykorzystywała mikrosystemy przepływowe typu *Cell-on-a-Chip*, będące formą pośrednią między warunkami *in vitro* a *in vivo*. Prowadzenie hodowli w warunkach przepływowych pozwoliło na odwzorowanie naturalnego przepływu w tkankach, stosunku powierzchni do objętości oraz interakcji międzykomórkowych. Badania przeprowadzono na sferycznych agregatach komórkowych – sferoidach, będących przybliżeniem guza nowotworowego, odwzorowującym warstwowe ułożenie komórek i nierównomierne dostarczanie składników do poszczególnych warstw. Wyniki badań w mikroukładach przepływowych wskazują na niższą skuteczność cytostatyczną magnetoliposomów z doksorubicyną przy tej samej dawce zastosowanej na sferoidach niż w hodowlach monowarstwowych. Uzyskanie porównywalnego efektu terapeutycznego magnetoterapii dla sferoidów jak dla hodowli w monowarstwie komórkowej wymaga zastosowania ok. 10 razy wyższego stężenia nośników z lekiem lub znaczne wydłużenie czasu inkubacji. Efekt ten wynika z trójwymiarowej struktury sferoidów, w której silne oddziaływania międzykomórkowe i macierz zewnątrzkomórkowa skutkują większą odpornością w stosunku do hodowli w monowarstwie. Badania przeprowadzone w ramach tego etapu pozwalają na uzyskanie warunków odwzorowujących efekt terapeutyczny zaproponowanej przez Doktorantkę magnetoterapii na środowisko guza nowotworowego.

Badania wykonane przez mgr inż. Edytę Maroń w ramach doktoratu oraz sposób ich opisu oceniam wysoko. Praca została napisana dobrze pod względem językowym, ma prawidłowy układ i stanowi uporządkowaną, dobrze przemyślaną całość. Podczas czytania napotyka się nieliczne błędy literowe oraz nieścisłości stylistyczne czy językowe, które nie wpływają na jakość pracy. Poniżej zamieszczam uwagi do niniejszej rozprawy:

1. W rozdziale 3. Autorka omawia podział materiałów pod względem własności magnetycznych wyjaśniając na czym polega ferromagnetyzm, ferrimagnetyzm i antyferromagnetyzm, a także superparamagnetyzm. W tym kontekście spodziewałam się także wyjaśnienia pojęcia paramagnetyzmu i diamagnetyzmu, dla całkowitego przedstawienia tematu. Wskazane byłoby wyjaśnienie różnicy między paramagnetykiem a superparamagnetykiem, ponieważ Doktorantka używa w pracy określenia superparamagnetyk, a w literaturze można spotkać się z przykładami modyfikacji liposomów także materiałami paramagnetycznymi np. kompleksami lantanowców, stosowanymi jako środek kontrastowy do obrazowania komórkowego metodą rezonansu magnetycznego.

2. W pracy wymiennie stosowane są oznaczenia H i B dla indukcji magnetycznej i natężenia pola magnetycznego. Na przykład na stronie 33 H opisano jako natężenie pola magnetycznego, podczas gdy na stronie 35, sądząc po jednostce, jako H oznaczono indukcję magnetyczną; na s. 101 – w podpisie tabeli jest natężenie, a w tabeli indukcja. W wykazie skrótów na końcu pracy brak jest wyjaśnienia symboli H i B . Dobrze byłoby doprecyzować te wielkości. W magnetyzmie zazwyczaj symbolem H oznaczane jest natężenie pola magnetycznego, a symbolem B – indukcja magnetyczna. Choć wielkości te faktycznie są do siebie wprost proporcjonalne i obie opisują pole magnetyczne ilościowo, to z punktu widzenia fizycznego są to odrębne wielkości, które mają różne jednostki. Jednostką indukcji jest T (w układzie SI: kg/As^2) lub $Gs=10^{-4} T$, a jednostką H jest w układzie SI A/m . Indukcja magnetyczna wewnątrz ośrodka jest równa natężeniu pola magnetycznego poza tym ośrodkiem pomnożonemu przez przenikalność magnetyczną ośrodka. H jest więc parametrem niezależnym od własności materiału czy ośrodka, w przeciwieństwie do indukcji magnetycznej, która już zależy od własności magnetycznych danego materiału.

3. strona 86 – Czy można byłoby tu podać dla porównania wartości nasycenia magnetycznego i koercji dla innych cząstek superparamagnetycznych?

4. Wykres 39 przedstawia cytotoksyczność magnetoliposomów z doksorubicyną zastosowanych w komórkach nowotworowych, po różnym czasie kierowania magnesem stałym. Obserwowany jest spadek żywotności komórek względem kontroli do 20% w obecności stałego pola magnetycznego i do 40% przy jego braku. Z czego wynika znaczny spadek żywotności

komórek wobec braku nakierowania magnetycznego, t.j. dlaczego dochodzi do biernej akumulacji magnetosomów z doksorubicyną?

Podsumowując, w ramach niniejszego doktoratu Pani mgr inż. Edyta Maroń opracowała, w hodowlach *in vitro*, oryginalny, nowy sposób celowanej terapii antynowotworowej z wykorzystaniem magnetoliposomów reagujących na zmienne pole magnetyczne niskiej częstotliwości. Choć w ostatnich latach prowadzone są badania nad wykorzystaniem magnetoterapii antynowotworowej, zazwyczaj uwalnianie leku realizowane jest na skutek hipertermii magnetycznej. Tej sytuacji towarzyszy jednak bezpośrednio lub pośrednio - poprzez indukowane magnetyczne prądy wirowe - wydzielanie ciepła, czego efektem są uszkodzenia otaczających guz zdrowych komórek. Zaproponowany przez Doktorantkę sposób uwalniania leku z magnetoliposomów polega na mechanicznym rozerwaniu dwuwarstwy lipidowej liposomu pod wpływem drgań superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza w zmiennym polu magnetycznym o niskiej częstotliwości, co jest nowym podejściem w stosunku do obecnych rozwiązań, pozwalającym na wyeliminowanie cytotoksycznego efektu termicznego towarzyszącego magnetoterapii. Potwierdzony został apoptotyczny mechanizm śmierci komórek nowotworowych, a także selektywność zaproponowanej metody terapeutycznej względem komórek nowotworowych, przy oszczędzeniu komórek prawidłowych. Na uznanie zasługuje fakt, że praca obejmowała bardzo szeroki zakres badawczy, począwszy od syntezy nanocząstek magnetycznych, magnetoliposomów i enkapsulacji leków, charakterystyki fizykochemicznej otrzymanych cząstek, badanie ich stabilności, cytotoksyczności, biokompatybilności, profilu uwalniania leków, optymalizacji parametrów pola magnetycznego zmiennego (uwalnianie leku) oraz stałego (dostarczanie leku) poprzez badanie typu śmierci komórkowej w rezultacie magnetoterapii, aż do wykonania mikroukładu przepływowego i przeprowadzenia w nim serii badań na sferoidach. Tak bogaty repertuar eksperymentalny wymagał zastosowania całego wachlarza metod badawczych, co pozwoliło na konsekwentne i szczegółowe zrealizowanie celu pracy. Efektem badań jest wniesienie nowej wiedzy dotyczącej magnetoterapii, a zaproponowany w ramach pracy kontrolowany system dostarczania leków przeciwnowotworowych może mieć także potencjał aplikacyjny. Szczegółowy przegląd literaturowy, a także szeroki, wielostronny i dogłębnie przemyślany zakres badawczy oraz sposób opisu wyników badań i ich wnikliwa dyskusja świadczą zarówno o dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki, jak i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.



Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Edyty Maroń spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Renata Toczyłowska-Mamin'ska