



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Prof. dr hab. Szczepan Zapotoczny
Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków
tel. 12 686 2530
Email: s.zapotoczny@uj.edu.pl

Wydział Chemii

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Edyty Maroń

**pt.: "Magnetoliposomy jako kontrolowany magnetycznie system
dostarczania leków przeciwnowotworowych do komórek w hodowlach
in vitro"**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Edyty Maroń obejmuje zagadnienia związane z opracowaniem i badaniem nowych liposomalnych nośników leków przeciwnowotworowych zawierających nanocząstki magnetyczne umożliwiające uwalnianie leków z tychże liposomów pod wpływem zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości. Tematyka pracy jest bardzo aktualna w kontekście poszukiwania nośników leków wrażliwych na odpowiednie bodźce zewnętrzne, w szczególności pole magnetyczne, umożliwiając magnetyczne sterowanie nośnikiem oraz kontrolowane uwalnianie leku, co miałyby ograniczać także efekty niepożądane i/lub uboczne stosowanych terapii antynowotworowych. Mechanizm uwalniania w nośnikach magnetycznych ograniczający efekt hipertermii magnetycznej był także istotnym celem tego ważnego naukowo i społecznie zadania badawczego, którego realizacji podjęła się Doktorantka w przedstawionej do recenzji pracy.

Promotorami w recenzowanej pracy doktorskiej byli Panowie prof. dr hab. inż. Michał Chudy z Politechniki Warszawskiej oraz prof. dr hab. Paweł Krysiński z Uniwersytetu Warszawskiego, co jest zrozumiałe w kontekście interdyscyplinarnego charakteru przeprowadzonych badań.

Recenzowana rozprawa w klasycznym układzie składa się z części literaturowej opisującej aktualny stan wiedzy w tematyce rozprawy oraz części prezentującej wyniki badań Doktorantki i ich szczegółową analizę, która poprzedzona jest przedstawieniem tez i celów pracy.

Poszczególne rozdziały części literaturowej omawiają zagadnienia bezpośrednio związane z tematyką pracy. Pierwszy rozdział obejmuje szczegółowy opis liposomów, ich typów, metod otrzymywania i badania oraz zastosowań, ze szczególnym uwzględnieniem nośników do kontrolowanego dostarczania i uwalniania leków. Kolejny rozdział gromadzi syntetycznie informacje na temat nanocząstek magnetycznych, ich otrzymywania i zastosowań, wprowadzając także podstawowe informacje o samym zjawisku magnetyzmu. Następny rozdział skupia się na przeglądzie dotychczasowej wiedzy w zakresie układów będących głównym zainteresowaniem badawczym Doktorantki, tj. magnetoliposomów. Poruszone są też krótko zagadnienia związane z hipertermią magnetyczną oraz wykorzystaniem zmiennego pola magnetycznego o niskiej częstotliwości do degradacji mechanicznej magnetoliposomów, które ma być efektywniejszym sposobem uwalniania leków niż hipertermia, z uwagi m.in. na brak zależności od przewodności cieplnej środowiska. Ostatni rozdział części literaturowej skupia się na układach mikroprzepływowych (Doktorantka używa terminu: mikrosystemy przepływowe), ich wytwarzaniu oraz wykorzystaniu do badania komórkowych, zarówno w modelach dwuwymiarowych, jak też sferoidach wielokomórkowych jako modelach wczesnych faz guzów nowotworowych.

Wszystkie podjęte zagadnienia zostały opisane w wystarczającym zakresie (łącznie ponad 160 cytowanych publikacji), poprawnie merytorycznie z wykorzystaniem przejrzystych ilustracji. Czytelnikowi daje to dobre tło dla przedstawionych dalej wyników badawczych. Pewien niedosyt pozostaje jedynie w zakresie liczby użytych rysunków, których jest jedynie 12 na całą część literaturową. Odpowiedni dobór dodatkowych ilustracji, nawet zaczerpniętych z literatury, dałby pełniejszy obraz opisywanych zagadnień oraz wzbogacił szatę graficzną całej pracy.

Część eksperymentalna składa się z zasadniczych pięciu rozdziałów omawiających osiągnięcia pracy Doktorantki oraz rozdział zawierający tezy i cele pracy i kolejny obejmujący materiały i metodykę badań. Klarownie zdefiniowane cele pracy doktorskiej obejmowały: (1) otrzymanie odpowiednich magnetoliposomów zawierających nanocząstki magnetyczne wbudowane w dwuwarstwę lipidową liposomów oraz zamknięte w ich wnętrzu hydrofilowe leki antynowotworowe, (2) nawigację magnetyczną magnetoliposomów za pomocą stałego pola magnetycznego oraz kontrolowane uwalnianie z ich wnętrza leków w wyniku działania zmiennego pola magnetycznego o niskiej częstotliwości, w celu minimalizacji efektu hipertermicznego, a także (3) przetestowanie uzyskanych układów do kontrolowanego dostarczania i uwalniania leków w warunkach hodowli komórkowych z naciskiem na hodowlę sferoidów wykorzystujące układy mikroprzepływowe, w celu lepszego modelowania rzeczywistych warunków biologicznych.

Kolejny rozdział w sposób przejrzysty i wyczerpujący opisuje szereg procedur stosowany w pracy Doktorantki, w tym zmodyfikowane i skalibrowane źródła pola magnetycznego, czy też wytworzone układy mikroprzepływowe, oprócz klasycznych metod charakterystyki wytworzonych materiałów (np. TEM, DLS, magnetometria, termograwimetria, itp.) oraz licznych metod wykorzystujących hodowlę komórkową.

Pierwszy rozdział obejmujący wyniki badawcze rozpoczyna charakterystyka otrzymanych nanocząstek magnetycznych z podaniem m.in. rozkładu ich rozmiarów oraz właściwości magnetycznych. Dalej Doktorantka przedstawia charakterystykę uzyskanych magnetoliposomów, których średnica nie różni się istotnie od samych liposomów bez magnetycznych nanocząstek i wynosi ok. 110 nm, a po wprowadzeniu leku (chlorowodorek doksorubicyny) jedynie nieznacznie wzrasta. Skuteczność enkapsulacji leku do obu typów liposomów określono na 40%, co jest stosunkowo zadawalającą wartością. Wykazano również, że dyspersja uzyskanych liposomów jest stabilna przez minimum 24h, co jest wartością wystarczającą dla prowadzenia testów komórkowych, choć trudno uznać ją za zadawalającą przy długotrwałym przechowywaniu leków w nośnikach. Z uwagi na możliwość agregacji (magneto)liposomów, każdorazowo do badań przygotowywano zatem świeżą próbkę. Co najważniejsze, w kontekście potencjalnych zastosowań, wykazano wbudowanie się wystarczającej ilości nanocząstek w liposomy, tak, aby stały się one podatne na działanie pola magnetycznego. W toku dalszych badań Doktorantka wykazała istotne uwalnianie doksorubicyny z magnetoliposomów jedynie pod wpływem zmiennego pola magnetycznego

(bez pola jedynie niewielki wpływ leku), które powoduje degradację liposomów, co zostało zobrazowane przy użyciu TEM.

Kolejny rozdział dotyczył określenia cytotoksyczności opracowanych nośników z wykorzystaniem wybranych linii komórkowych prawidłowych i nowotworowych. Zarówno nośniki liposomalne, jak też same nanocząstki magnetyczne okazały się być nietoksyczne pod nieobecność zmiennego pola magnetyczne, podczas gdy, zgodnie z oczekiwaniem, toksyczność ta została istotnie zwiększona w wyniku uwalniania doksorubicyny po inkubacji komórek z magnetoliposomami z lekiem oraz ekspozycji na zmienne pole magnetyczne. Co istotne, wpływ uwalnianej magnetycznie doksorubicyny na cytotoksyczność był większy dla linii komórek nowotworowych (MCF-7) niż komórek prawidłowych (MCF-104). Wskazuje to na potencjał aplikacyjny wytworzonych magnetoliposomów z doksorubicyną w terapii antynowotworowej, także z uwagi na występowanie pożądanego efektu terapeutycznego dla pól magnetycznych uznawanych za bezpieczne w terapii. W następnym kroku Doktorantka optymalizowała parametry pola magnetycznego w celu maksymalizacji efektu magnetocytotoksycznego. Uzyskane wyniki wskazują na dominujący wpływ wielkości indukcji magnetycznej przy braku zależności od częstotliwości, czy też przebiegu zmienności pola (sinusoidalny, prostokątny, liniowy). Potwierdziła także, że dominującym typem śmierci komórkowej, wywołanej magnetocytotoksycznością spowodowaną obecnością badanych magnetoliposomów, jest apoptoza, co jest efektem pożądanym.

Rozdział 5 opisuje wyniki eksperymentów związanych z dostarczaniem załadowanych magnetoliposomów do komórek nowotworowych przy użyciu stałego pola magnetycznego. Doktorantka wykazała istotny wpływ naprowadzania przy użyciu pola magnetycznego na finalną cytotoksyczność (po uwolnieniu doksorubicyny w wyniku działania zmiennego pola magnetycznego). Wyniki eksperymentów wskazują na możliwość zastosowania wspomaganego magnetycznie naprowadzania nośników do tkanki nowotworowej i przytrzymywania jej w miejscu działania ograniczając w ten sposób oddziaływanie cytotoksyczne na komórki prawidłowe.

Kolejny rozdział opisuje wyniki eksperymentów prowadzonych w układach mikroprzepływowych, które powinny lepiej naśladować dynamiczne warunki w organizmach żywych niż hodowle 2D. Także w takich układach udało się zaobserwować zwiększoną akumulację nośników magnetycznych z doksorubicyną w obszarach, w których znajdował się magnes stały. Doktorantka przeprowadziła również badania z wykorzystaniem sferoidów

komórkowy, które wykazał także megnetocytotoksyczność zaproponowanych nośników z doksorubicyną, ale z uwagi na ich większą odporność, konieczne były wyższe stężenia i/lub dłuższy czas inkubacji dla osiągnięcia podobnych efektów jak dla hodowli 2D.

W ostatnim rozdziale eksperymentalnym Doktorantka przedstawia skrótowo wyniki prac na temat enkapsulacji innego leku w magnetoliposomach. Uzyskane wyniki potwierdzają uniwersalność otrzymanych liposomów magnetycznych umożliwiając dostarczanie i stymulowane magnetycznie uwalnianie różnych hydrofilowych leków antynowotworowych.

Przedstawiony przegląd jednoznacznie wskazuje, że Doktorantka osiągnęła zaplanowane cele pracy doktorskiej weryfikując pozytywnie postawione hipotezy badawcze dotyczące efektywnej terapii antynowotworowej z wykorzystaniem magnetoliposomów uwalniających hydrofilowy lek pod wpływem zmiennego pola magnetycznego niskiej częstotliwości. Istotnym osiągnięciem niniejszej pracy doktorskiej jest wykazanie, że uwalnianie leku z magnetoliposomu następuje w wyniku degradacji mechanicznej, a nie wzrostu temperatury, który prowadziłby do upłynnienia błony liposomalnej, ale mógłby mieć także wpływ na sam lek i/lub mechanizm śmierci komórkowej.

Cała część eksperymentalna została klarownie napisana z uwzględnieniem także dobrze uzasadnionych wniosków z badań. Z racji roli recenzenta chciałbym się jednak odnieść do pracy także w postaci kilku komentarzy i uwag polemicznych.

(1) W charakterystyce nanocząstek magnetycznych brak jest nieco bardziej dokładnej charakterystyki strukturalnej z wykorzystaniem np. XRD lub spektroskopii Mössbauera. Pomimo wykorzystania znanej procedury do otrzymania nanocząstek, ich rzeczywisty skład bardzo często odbiega od postulowanego magnetytu, co może mieć także wpływ na zmierzoną wielkość namagnesowania poza wpływem obecności warstwy organicznej, który został prawidłowo zaproponowany.

(2) Badania uwalniania doksorubicyny z nośników wykorzystywały fluorescencję tej substancji i jej wygaszanie przy dużym stężeniu obecnym we wnętrzu liposomów. Oprócz obserwacji intensywności fluorescencji dla jednej długości fali emisji przydałoby się jednak zbieranie i prezentowanie całych widm fluorescencji (brak widm w pracy doktorskiej), bo także profil widma, długość fali w maksimum emisji może się zmieniać wraz ze zmianą otoczenia cząsteczek w trakcie indukowanej magnetycznie destrukcji magnetoliposomów. Na podstawie tych informacji można byłoby także wnioskować na temat możliwych mechanizmów destrukcji liposomów oraz lokalizacji leku po tym procesie.

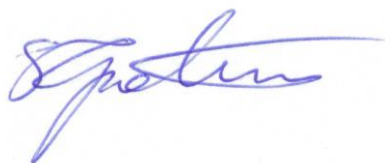
(3) Str. 97. Niezrozumiałe jest stwierdzenie „Zmniejszenie intensywności fluorescencji DOX może być związane z częściową utratą energii emisji podczas uwalniania doksorubicyny z magnetoliposomów pod wpływem AFM-LF”. Wydaje się jednak, że dochodzi do częściowego wygaszenia fluorescencji, a przedstawione dalej spekulacje na temat powodów tego wygaszenia są prawdopodobne i racjonalne.

(4) Rozdział 4.1. Niektóre opisy w tym rozdziale, a w szczególności opis rys. 30 wskazują na użycie pola magnetycznego, choć, jak rozumiem, te testy miały być bez pola magnetycznego, którego wpływ jest szczegółowo opisany w rozdziale 4.2. Proszę o wyjaśnienia.

(5) Czy w eksperymentach z wykorzystaniem stałego pola magnetycznego do przemieszczania magnetoliposomów umieszczenie magnesu pod warstwą komórek jest optymalną geometrią układu? Czy wpływ osadzania w polu grawitacyjnym może być istotny w takim układzie?

W podsumowaniu stwierdzam, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki prac badawczych przedstawionych w recenzowanej dysertacji niosą istotne wartości poznawcze oraz znaczenie w zakresie nośników substancji aktywnych, które mogą być celowo dostarczane i uwalniane na życzenie pod wpływem pola magnetycznego. Doktorantka wykazała się umiejętnością prowadzenia pracy badawczej na wysokim poziomie, krytycznego spojrzenia na uzyskiwane wyniki oraz wyciągania rzetelnych wniosków na ich podstawie. Wyniki badań objętych niniejszą dysertacją, zgodnie z deklaracją Doktorantki, zostały opublikowane w trzech publikacjach naukowych, a Pani mgr inż. Edyta Maroń jest jeszcze współautorką jednej publikacji nie związanej z tematem rozprawy.

Oceniając pozytywnie recenzowaną pracę stwierdzam, że spełnia ona wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” - tekst jednolity: DzU z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.). Wnoszę, zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Edyty Maroń do obrony pracy doktorskiej.



Szczepan Zapotoczny