

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Karoliny Werengowskiej-Ciećwierz pt. „Nanorurki węglowe w celowanej terapii przeciwnowotworowej”

Nanotechnologia jest jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin, ma charakter interdyscyplinarny obejmując fizykę, chemię, inżynierię materiałową, biologię, medycynę. Nanostruktury (nanomateriały) o rozmiarach zawierających się w zakresie 1-100 nm i dużym stosunku powierzchni do objętości znajdują coraz więcej zastosowań. Są obiektem badań zarówno o charakterze podstawowym, jak i aplikacyjnym. Szczególne zainteresowanie wzbudzają nanomateriały węglowe: nanorurki węglowe i grafen.

Jednym z bardziej obiecujących kierunków zastosowań nanomateriałów jest terapia przeciwnowotworowa, gdzie istotnym zagadnieniem jest wprowadzanie odpowiedniej dawki leku powodującej zniszczenie komórek nowotworowych przy jedynie minimalnym uszkodzeniu zdrowych tkanek. Chodzi tu o zaawansowane metody leczenia obejmujące kontrolowane i celowane dostarczanie leków za pomocą nanomateriałów w układach „drug delivery system”. Celem takich układów – nanonośników jest dostarczanie leków z ustaloną szybkością oraz w zdefiniowanym czasie. Prowadzone są intensywne badania nad zastosowaniem nanomateriałów we wspomnianych układach celowanego dostarczania terapeutyków. Materiały nanostrukturalne stanowią obiecującą grupę nanonarzędzi do zastosowania w terapii na poziomie komórkowym oraz molekularnym ze względu na liczne zalety. W układach dostarczania leków (UDL) rozpatrywane były: liposomy oraz lipidy, micelle, nanocząsteczki polimerowe, nanorurki, czy nanorogi węglowe. Mimo ogromnej liczby publikacji dotyczących zastosowania nanomateriałów w leczeniu chorób nowotworowych, spotyka się relatywnie mało doniesień na temat walki z czerniakiem za pomocą nanorurek węglowych w UDL. Stało się to inspiracją do podjęcia badań przez Autorkę recenzowanej pracy. Wiązało się to z koniecznością zrealizowania obszernego programu badawczego. Mgr Karolina Werengowska-Ciećwierz podjęła się bardzo ambitnego zadania. Przed przystąpieniem do badań zgromadziła i przeanalizowała ogromną literaturę przedmiotu.

Obszerna, licząca 83 strony **część teoretyczna** pracy (II) poświęcona krytycznemu przeglądowi literatury przedmiotu składa się z trzech rozdziałów. W pierwszym z nich (rozd. 1) omówiona jest idea celowanej terapii przeciwnowotworowej. Poruszone są tu dwa zagadnienia: celowane ligandy i leki przeciwnowotworowe. Każdy z tych tematów omówiony jest jedynie w zakresie niezbędnym dla realizowanego celu i zakresu pracy. Następny rozdział 2 poświęcony jest nanocząsteczkom w układzie dostarczania leków (UDL). Najpierw, krócej przedstawione jest znaczenie prawidłowego podawania leków – w tym rola nanocząsteczek, a potem obszerniej układ dostarczania leków.

Tematem ostatniego, najobszerniejszego z rozdziałów części teoretycznej (rozd. 3) były nanorurki węglowe w UDL. Kolejno przedstawiono w nim charakterystykę nanorurek węglowych, ich modyfikację do celów medycznych, dalej metody biokonjugacji celowanych ligandów oraz kolejno leków przeciwnowotworowych i wreszcie istotne zagadnienia, jakimi są potencjalna toksyczność nanorurek węglowych oraz ich zachowanie w organizmie. Wszystkie zagadnienia omówione w części literaturowej pracy, ich wybór i kolejność tworzą logiczną całość dobrze podbudowaną przeprowadzone w pracy badania oraz interpretację i dyskusję uzyskanych wyników. Autorka wykazuje się znakomitą znajomością doniesień literaturowych w tematyce związanej z rozprawą doktorską. Duża część cytowanych pozycji pochodzi z ostatnich kilku lat.

Analiza stanu wiedzy w oparciu o zgromadzoną literaturę pozwoliła na sformułowanie celów pracy i wytyczenie jej zakresu. Głównym celem pracy było zaproponowanie potencjalnego leku przeciwko nowotworowi skóry na bazie jednościennych nanorurek węglowych w roli nanonośników leków. Nanorurki węglowe zostały zastosowane jako kontenery trzech preparatów platyny(II): stosowanego w klasycznej terapii przeciwnowotworowej modelowego chemioterapeutyku – *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], *cis*-[PtCl₂(dbtp)₂] i nowego kompleksu *cis*-[Pt(C₄H₄O₅)(dbtp)₂]. Dwa ostatnie zostały użyte w UDL po raz pierwszy. Wykorzystanie nanorurek węglowych w UDL wymagało odpowiedniego wyboru materiału wyjściowego, a następnie poddanie go stosownej modyfikacji oraz wszechstronnej charakterystyce jego parametrów strukturalnych, chemii powierzchni i właściwości toksycznych. Dalszy krok na drodze do opracowania skutecznej metody syntezy UDL poprzez zastosowanie metod adsorpcyjnych jako techniki akumulowania chemioterapeutyków, wymagał charakterystyki otrzymanych UDL dla

określenia właściwości chemicznych i toksycznych kontenerów oraz wpływu nanorurek na skuteczność działania proleków.

Część eksperymentalna pracy (licząca 93 str.) podzielona jest w bardzo przejrzysty sposób. Zawiera trzy rozdziały. Pierwszy (rozdz. 1) – Materiały i metody zawiera przedstawione i omówienie kolejno: materiały stosowane do badań (jednościenne nanorurki węglowe, kompleksy platyny(II), przeciwciało CD133, linie komórkowe CHO, MSC, CRL i HTB); synteza układów badawczych (modyfikacja nanorurek węglowych, adsorpcja fizyczna oraz chemiczna (sprzężenie chemiczne) kompleksów platyny(II) na modyfikowanych nanorurkach węglowych, sprzężenie chemiczne przeciwciała CD133 do układów A0-o-CX-chem (trzy etapy)); metody badawcze zastosowane do charakterystyki otrzymanych układów (termogravimetria – TG, adsorpcja/desorpcja N₂ w temp. 77 K, spektroskopia Ramana, analiza XPS, TPD z analizą gazów – IR, pomiar potencjału zeta, miareczkowanie metodą Boehma, spektroskopia w podczerwieni – FTIR, pomiar entalpii imersji, pomiar pH suspensji, analiza elementarna, mikroskopia elektronowa HRTEM, analiza powierzchni EDS/EDX, pomiar kinetyki uwalniania leków, badanie toksyczności *in vitro* (hodowla komórek CHO, MSC; testy MTT i LDZ.), analiza metodą cytometrii przepływowej); zastosowanie nowych UDL w terapii przeciwnowotworowej – badania *in vitro* oraz *in vivo*.

Rozdział 2. Rezultaty obejmuje kolejne etapy przeprowadzonych badań i przedstawia uzyskane w ich toku wyniki. W podrozdziale 2.1 podane są wyniki badań właściwości fizykochemicznych stosowanych w pracy nanorurek węglowych przed i po ich modyfikacji w procesie hydrotermalnym (z użyciem 30% roztworu H₂O₂ w temperaturach 453-523 K). Są to obliczone z izoterm adsorpcji N₂ powierzchnie właściwe (malejące ze wzrostem temperatury procesu) oraz ubytek masy (rosnący z rosnącą temperaturą). Ciekawe są wyniki pomiarów entalpii imersji w metanolu i benzenie. Pierwsze z nich rosną ze wzrostem temperatury procesu i ubytkiem masy, drugie maleją jak powierzchnia S_{BET}. Zdjęcia HRTEM oraz widma Ramana wykazały, że ze wzrostem temperatury przebiegają różne procesy np. wypalenie węgla amorficznego. Ilość grup zasadowych też nie wykazuje prostej korelacji z temperaturą procesu. Badania dotyczące wprost chemii powierzchni (pH suspensji, zawartość tlenu, stężenie grup kwasowych, dane z analizy XPS, emisja CO₂ z widma TPD, zeta potencjał) dały natomiast wyniki skorelowane ze sobą i wskazujące, że wzrost temperatury utleniania (w zakresie 453-523 K) powodował zwiększenie stopnia utlenienia nanorurek i ich polarności.

Do dalszych badań wytypowano nanorurki utleniane w temp. 493 K, oznaczone A0-o-493 (o optymalnych właściwościach dla zastosowania w roli kontenerów przeciwnowotworowych leków – kompleksów platyny(II)). Podrozdział 2.2 poświęcony jest charakterystyce układów nanorurka-lek. Efekty nanoszenia chemioterapeutyków różnymi metodami były oceniane metodami TG w atmosferze powietrza, HRTEM, EDX, adsorpcji N₂, spektroskopii IR. Porównywane było nakładanie kompleksów z wody i DMF. Określana była kinetyka ich uwalniania. Właściwości toksyczne uzyskanych UDL charakteryzowane były za pomocą testów MTT i LDH. W podrozdziale 2.3 określana była charakterystyka układów przeciwciało-nanorurka węglowa-lek. Do badań próbek A0-o-CX-chem-CD133 stosowane były: adsorpcja azotu, analiza elementarna, spektroskopia IR oraz analiza metodą cytometrii przepływowej. Podrozdział 2.4 stanowi praktyczną weryfikację poprzednich badań, ocenione jest potencjalne zastosowanie UDL w terapii przeciwnowotworowej przeciwko wybranym liniom komórkowym czerniaka i wyselekcjonowanym modelom zwierzęcym. W badaniach *in vitro* wykorzystane były 4 linie komórkowe czerniaka i zastosowane cztery różne stężenia próbek w szerokim zakresie (10-250 µg/ml). Przebadane zostały trzy kompleksy platyny dla różnych sposobów związania z nanorurkami. W badaniach *in vivo* przeprowadzonych dla potwierdzenia przydatności nanorurek w UDL przetestowano trzy typy układów oceniając średnią przeżycia w grupie myszy. Część eksperymentalną kończy podrozdział 3. Podsumowanie wyników.

Pracę kończą **Wnioski** (V) oraz **Streszczenie** (VI) i **Summary** (VII), dalej następuje wykaz cytowanej literatury – **Bibliografia** (cz. VIII) – obejmuje imponującą liczbę ponad 550 pozycji (w tym 8 prac Autorki).

Wnioski sformułowane są w sposób na ogół zwięzły i klarowny. Pierwszy wniosek informuje o zrealizowaniu głównego celu pracy. Dalsze trzy wnioski to potwierdzenie trafnego wyboru zastosowanej metody modyfikacji nanorurek. Kolejne dwa wnioski dotyczą przyłączania chemioterapeutyków do wybranych utlenionych nanorurek oraz oceny efektów stosowania różnych technik. Dalsze dwa wnioski wskazują na rolę dyspersji i lokalizacji kompleksów platyny w ich uwalnianiu oraz na efekty obecności nanorurek dla skuteczności działania chemioterapeutyków (zwiększenie ich rozpuszczalności, dyspersji i aktywności cytotoksycznej). Następne dwa wnioski to stwierdzenie, że nie ma jednego przeciwnowotworowego UDL o działaniu skutecznym w stosunku do wszystkich

analizowanych linii komórkowych, i że zależy ono od podawanej dawki, linii i metody nakładania leku na nanorurki. Dalej zostało wykazane, że szybciej działa lek nanoszony metodą fizyczną w porównaniu z zastosowaniem sprzężenia chemicznego z nanorurką. W kolejnych dwóch wnioskach wykazane zostało, że opracowano efektywną biokoniugację przeciwciała CD133 do nanorurek oraz, że UDL sprzężone z CD133 polepszają skuteczność działania leków w układzie *in vivo*, w wyniku terapii celowanej. Na koniec wykazano, że nanorurki z zaadsorbowaną cisplatyną mogą stanowić onkostatyczny opatrunek w celu prewencji wznowy miejscowej po operacji narządów z powodu czerniaka. Wszystkie wnioski są dobrze umotywowane.

Lektura pracy nasuwa kilka uwag. Pierwsza to zawartość bardzo obszernego (26 stron) podrozdziału 2.1. Charakterystyka modyfikowanych nanorurek ... Najpierw omawiane są zmiany właściwości fizykochemicznych będące wynikiem ich modyfikacji, a potem wyniki badań pod kątem ewentualnych właściwości toksycznych. Dla poprawy przejrzystości tekstu można było podrozdział 2.1 podzielić na dwie części 2.1.1 i 2.1.2 poświęcone obu wspomnianym wątkom. Druga uwaga to pewne niedociągnięcia w Bibliografii: w pozycji Werengowska-Ciećwierz K., Wiśniewski M., Terzyk A.P., Roszek K., Czarnecka J., Bolibok P., Rychlicki G., (2015b), w recenzji, brakuje informacji, do jakiego czasopisma został przesłany ten artykuł; w pozycji Wiśniewski M., Furmaniak S., Kowalczyk P., Werengowska K.M., Rychlicki G., *Chem. Phys. Lett.* **538** (2012a) 9 błędnie podany jest numer strony, powinno być 93. Kolejna uwaga to pytanie do Autorki: dlaczego w Bibliografii nie jest zamieszczony artykuł Terzyk A.P., Wiśniewski M., Dulaska K., Bielicka A., Gauden P.A., Furmaniak S., Werengowska-Ciećwierz K., Carbon nanotubes as potential material for drug delivery – experiment and simulation, *Adsorption* **19**, 2013, 269. Mógłby on być zacytowany np. w podrozdziale 2.2 lub w rozdziale 3. Nanorurki węglowe w UDL w części teoretycznej pracy.

W tekście pracy występuje też pewna liczba usterek literowych. Powyższe uwagi nie wpływają na w pełni pozytywną ocenę całości.

Ogólnie można stwierdzić, że opiniowana praca doktorska wnosi istotne elementy nowości naukowej, zarówno w części badawczej jak i interpretacyjnej. Wybór i sposób omówienia przez Autorkę tematów zawartych w części teoretycznej pracy wskazuje natomiast na bardzo dobrą znajomość literatury przedmiotu. Z kolei część eksperymentalna

odznacza się trafnym z punktu widzenia celów pracy wyborem zastosowanych metod badawczych i dużą liczbą wykonanych pomiarów. Interpretacja i analiza uzyskanych wyników przynosi wiele nowych i wartościowych informacji. Tekst rozprawy jest napisany w sposób jasny i klarowny. Należy podkreślić szatę graficzną pracy: bardzo starannie wykonane rysunki, tabele, wzory i równania.

Wniosek końcowy

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia całkowicie wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Autorka jasno określiła zagadnienia naukowe, które stanowiły cel pracy, a otrzymane w niej wyniki i ich interpretacja znacznie poszerzają dotychczasowy stan wiedzy na temat nowych układów leków przeciwko nowotworowi czerniaka w porównaniu z klasyczną terapią.

Zwracam się, więc do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z wnioskiem o przyjęcie pracy oraz dopuszczenie mgr Karoliny Werengowskiej-Ciećwierz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uważam, że ze względu na istotne elementy nowości naukowej, pomyślnie zrealizowany bardzo obszerny program badawczy, przejrzysty sposób opracowania dużej liczby uzyskanych wyników oraz duże ich znaczenie praktyczne praca zasługuje na wyróżnienie. Na podkreślenie zasługuje też bogaty dorobek publikacyjny Autorki. Osiem artykułów (w tak renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej, jak m.in. Journal of Colloid and Interface Science (IF=3,07), Carbon (IF=6,16), Chemical Physics Letters (IF=2,15), Biomedicine and Pharmacotherapy (IF=2,11)) jest zacytowanych w rozprawie i podanych Bibliografii. Łącznie, mgr Karolina Werengowska-Ciećwierz jest współautorką aż piętnastu artykułów.

Prof. dr hab. inż. Andrzej Świątkowski