



Kraków, 16 marca 2015

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Werengowskiej-Ciećwierz

Nanorurki węglowe w celowanej terapii

przeciwnowotworowej

1. Uwagi wstępne

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska pani mgr Karoliny Werengowskiej-Ciećwierz została przygotowana pod kierunkiem Prof. dr hab. Artura P. Terzyka oraz dr Marka Wiśniewskiego (jako promotora pomocniczego) w Katedrze Chemii Materiałów, Adsorpcji i Katalizy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Rozprawa liczy 219 stron podzielonych na 8 rozdziałów. Pierwsze 2 rozdziały mają charakter przeglądu literatury dotyczącej celowanej terapii przeciwnowotworowej, zastosowania różnego typu nanocząstek jako nośników leków przeciwnowotworowych oraz wykorzystania w tym celu nanorurek węglowych. Druga część pracy (rozdziały 3-5) poświęcona jest prezentacji badań własnych Autorki rozprawy. Ostatnie 3 rozdziały pracy to podsumowanie wyników w języku polskim i angielskim oraz bibliografia.

2. Ocena dorobku naukowego

Ponieważ do rozprawy nie dołączono podsumowania dorobku naukowego Autorki zatem do jego oceny posłużyłem się informacjami dostępnymi w naukowych bazach danych. Według bazy Scopus pani mgr Karolina Werengowska-Ciećwierz jest współautorką 7 prac opublikowanych w czasopismach posiadających impact factor tj. *Adsorption*, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *Journal of Physical Chemistry C*, *Chemical Physics Letters* oraz *Carbon*. Wszystkie te czasopisma posiadają wysokie wartości wskaźnika IF przy czym czasopisma *Carbon* oraz *Journal of Physical Chemistry C* osiągają bardzo wysokie wartości indeksu cytowań (odpowiednio 6.16 i 4.835). Rozprawa doktorska wydaje się być oparta głównie na wynikach opublikowanych w pracy *Nanotube-mediated efficiency of cisplatin anticancer therapy*, *Carbon* 70 (2014) 46-58 której pani mgr Karolina Werengowska-Ciećwierz jest pierwszym autorem. Powyższy dorobek naukowy, udokumentowany publikacjami w czasopismach z listy filadelfijskiej, jest zatem w zupełności wystarczający do poparcia tez zawartych w rozprawie doktorskiej oraz świadczy do dojrzałości naukowej Autorki.

3. Tematyka rozprawy doktorskiej

Tematyka badań podjętych w rozprawie dotyczy opracowania układu celowanego dostarczania leków na bazie nanorurek węglowych i kompleksów platyny oraz oceny jego skuteczności w terapii czerniaka. Zakres badań jest bardzo szeroki. Począwszy od syntezy poprzez weryfikację założonych struktur molekularnych, ocenę toksyczności aż po badania cytotoksyczności dla kilku linii komórek nowotworowych i badania *in vivo* na modelu zwierzęcym. Na każdym etapie badań podejmowane są próby krytycznej analizy wyników i zrozumienia mechanizmów zachodzących procesów.

4. Analiza części literaturowej

Część literaturową rozprawy Autorka rozpoczyna zwięzłą prezentacją idei terapii celowanej. Opisane są istotne kwestie związane ze skutkami ubocznymi leków przeciwnowotworowych oraz koncepcje ich minimalizacji przy zastosowaniu terapii celowanej według mechanizmu pasywnego i aktywnego. Oba mechanizmy są w sposób zwięzły lecz wystarczający opisane i przedyskutowane. Następnie dyskutowana jest rola i wybór ligandów w terapii celowanej według mechanizmu aktywnego. Autorka wymienia i krótko charakteryzuje najczęściej badane ligandy takie jak kwas foliowy, przeciwciała czy aptamery. W kolejnym podrozdziale opisane są najczęściej stosowane leki antynowotworowe wraz z krótką charakterystyką mechanizmów ich działania. Najwięcej uwagi Autorka poświęca opisowi leków opartych na kompleksach platyny. Przedstawiony jest szczegółowy mechanizm działania kompleksów platyny na przykładzie najbardziej znanej i najczęściej stosowanej formy czyli cisplatyny. Omówiono rolę tworzenia akwakompleksów platyny i ich cytotoksyczności w stosunku do komórek nowotworowych jak i zdrowych, brak selektywności działania przy użyciu standardowych metod administracji leku a także pewne metody minimalizacji skutków ubocznych pochodnych platyny opartych na zastosowaniu tzw. proleków.

W rozdziale 2 Autorka omawia znaczenie nośników leków opartych na strukturze różnego typu nanomateriałów. Wykorzystanie takich układów ma na celu dostarczenie substancji aktywnej w miejsce docelowe w sposób minimalizujący oddziaływanie z komórkami zdrowymi a także wykorzystanie cząsteczek leków o słabej biodystrybucji związanej z np. słabą rozpuszczalnością czy trudnością z przenikaniem przez bariery biologiczne. Następnie Autorka bliżej charakteryzuje takie układy dostarczania leków jak: liposomy oraz lipidy, micelle, nanocząstki polimerowe, dendrymery, nanorurki i nanorożki węglowe. Istotnie, są to najczęściej badane struktury i niektóre z nich są nawet w fazie badań klinicznych. Wydaje mi się jednak, że nieco więcej uwagi należało poświęcić nanocząstkom superparamagnetycznym. Układy te realizują złożoną funkcję teranostyków gdyż jednocześnie pełnią rolę czynnika kontrastowego w obrazowaniu MRI, po przyłączeniu cząstek leku do ich powierzchni mogą pełnić rolę nośnika, mogą być zlokalizowane w określonym miejscu przy użyciu zewnętrznego pola magnetycznego, w końcu możliwe jest

ich wykorzystanie w termicznym niszczeniu tkanki nowotworowej (hypertermia) przy użyciu zmiennych pól magnetycznych.

W kolejnym podrozdziale Autorka szczegółowo omawia strukturę i właściwości nanorurek węglowych jak również typowe metody ich funkcjonalizacji. Wiele uwagi poświęca metodom utleniania nanorurek prowadzących do utworzenia na ich powierzchni lub krawędziach reaktywnych grup funkcyjnych. Podkreśla zalety metody hydrotermalnej z wykorzystaniem nadtlenu wodoru jako, że metoda ta będzie wykorzystana w trakcie syntezy materiałów do badań własnych. W kolejnych rozdziałach części literaturowej następuje bardzo szczegółowy opis, wraz z podaniem mechanizmów reakcji, metod funkcjonalizacji nanorurek oraz chemii przyłączania różnorodnych ligandów organicznych oraz cząsteczek leków antynowotworowych do powierzchni nanorurek węglowych. Dyskutowane są modele w których lek wiązany jest w wewnętrznej strukturze CNT oraz przyłączony do powierzchni bocznej. Przedstawiona analiza doniesień literaturowych dotyczących wiązania cząsteczek leków z nanorurkami węglowymi jest bardzo wyczerpująca i świadczy o doskonałej znajomości najnowszych osiągnięć naukowych w tym zakresie.

W kolejnym podrozdziale pracy Autorka porusza kwestię toksyczności nanorurek węglowych. Jest to dość sporny temat i przedstawiona przez Autorkę konkluzja, że potrzebna jest kompleksowa ocena profilu toksyczności nanorurek z uwzględnieniem wielu aspektów a w szczególności wielkości dawki i czasu podawania jest trafna. Część literaturową pracy kończy analiza zachowania się nanorurek węglowych w organizmie. Autorka dyskutuje możliwe mechanizmy oddziaływania nanorurek z komórkami a w szczególności mechanizmy wnikania do wnętrza komórki.

Przeprowadzona przez Autorkę analiza doniesień literaturowych dowodzi jej doskonałej orientacji w tematyce dotyczącej rozprawy doktorskiej. Zatem, badania własne, opisane w dalszej części pracy, należy uznać za dobrze umotywowane.

5. Analiza części badawczej

W rozdziale 3 Autorka formułuje cel pracy. Jest to synteza i badanie właściwości 3 typów układów mających funkcjonować jako leki przeciwko nowotworowi skóry. Układy te to nanorurki węglowe z przyłączonymi trzema formami pochodnych Pt(II) czyli, cis-[PtCl₂(NH₃)₂] (C1), cis-[PtCl₂(dbtp)₂] (C2) i nowy kompleks Pt[(C₄H₄O₅)(dbtp)₂] (C3). Dodatkowo badany będzie układ z przyłączonym przeciwciałem CD133 w celu zbadania zachowania się wybranych układów w terapii celowanej.

W kolejnym rozdziale następuje opis wykorzystanych w badaniach materiałów, a więc nanorurek węglowych (jednościenne o średnicy 1-2 nm), kompleksów platyny wraz opisem reakcji prowadzących do otrzymania C2 i C3 oraz różnego typu linii komórkowych. Następnie opisane są procedury aktywacji nanorurek węglowych metodą hydrotermalną, przyłączania do nich Cx z wykorzystaniem adsorpcji fizycznej bądź funkcjonalizacji

kowalencyjnej i w końcu metodyki przyłączania przeciwciała CD133 do układów z chemicznie sprzężonymi formami Cx.

Do oceny przygotowanych próbek stosowano następujące metody badawcze: analizę termogravimetryczną, niskotemperaturową adsorpcję azotu, spektroskopię Ramana, spektroskopię XPS, temperaturowo programowaną desorpcję, pomiary potencjału zeta, miareczkowanie, spektroskopię IR, mikroskopię HRTEM, spektroskopię EDS/EDX i kilka innych. Aktywność biologiczną próbek *in vitro* oceniano przy zastosowaniu testów MTT, testów LDH, cytometrii przepływowej oraz monitorowania wzrostu komórek natomiast badania *in vivo* prowadzone były na myszach.

Prezentacja i dyskusja uzyskanych wyników rozpoczyna się na stronie 118 analizą niskotemperaturowych izoterm adsorpcji azotu dla nanorurek aktywowanych w różnych temperaturach. Tabela 8 przedstawia podstawowe parametry fizykochemiczne uzyskanych próbek. Wyniki potwierdzają spadek porowatości materiału wraz ze wzrostem temperatury obróbki hydrotermalnej oraz wzrost polarności powierzchni (entalpie imersji w MeOH oraz benzenie). Wydaje się jednak, że obróbka hydrotermalna wprowadza stosunkowo niewielką ilość grup polarnych na powierzchnię nanorurek. W porównaniu do materiału wyjściowego następuje tylko ok. 3-krotny wzrost entalpii imersji w MeOH dla próbki obrabianej w najwyższej temperaturze. Zakładając, że próbka wyjściowa zawiera bardzo mało takich grup (naturalne nanorurki są wysoce hydrofobowe) to 3-krotny wzrost ich ilości oznacza ciągle ilość niewielką. Zdjęcia HRTEM potwierdzają oczyszczenie nanorurek z pozostałości węgla amorficznego i jednocześnie brak destrukcji struktury co zwykle ma miejsce przy zastosowaniu agresywnych środków utleniających. Analiza widm Ramana potwierdza istnienie atomów węgla o hybrydyzacji sp² oraz sp³ zaś analiza stosunku sygnałów pochodzących od atomów sp³ do sp² sugeruje istnienie minimum tej wartości dla próbki A0-0-473. Stwierdzenie, że stosunek ten jest niski dla materiałów o niewielkiej zawartości węgla sp² jest chyba przejęzyczeniem.

Zebrane w Tabeli 9 wyniki dotyczące właściwości kwasowo-zasadowych badanych próbek potwierdzają wzrost kwasowości wraz ze wzrostem temperatury procesu hydrotermalnego. Znowu obserwuje się niewielki bo tylko ok. 3-krotny wzrost ilości grup kwasowych w stosunku do próbki niemodyfikowanej. Natomiast analiza widm XPS prowadzi do konkluzji, że ilość grup karboksylowych powstała w wyniku procesu hydrotermalnego jest tylko o ok. 1% większa od ilości tych grup na powierzchni próbki niemodyfikowanej. Niemniej jednak zachowany jest trend wzrostowy ilości tych grup wraz ze wzrostem temperatury obróbki. Wyniki pomiaru potencjału zeta są dość zaskakujące, mianowicie próbka niemodyfikowana wykazuje ujemny potencjał zeta o wartości ok. -10mV w pH7. Nie jest to wartość duża niemniej jednak świadczy ona albo o obecności ujemnie naładowanych grup funkcyjnych albo o adsorpcji anionów w warstwie zwartej. Trudno też zgodzić się ze stwierdzeniem, że „obserwowany jest jedynie niewielki dodatni zeta potencjał nanorurek

węglowych w zakresie kwaśnego pH”. Wartości rzędu 27-30 mV nie są wcale małe i właściwie taka próbka w pH4 zbliża się już do obszaru stabilności koloidalnej.

Przeprowadzone testy cytotoksyczności oraz witalności na dwóch liniach komórek CHO oraz MSC dają dość złożony obraz toksyczności badanych próbek. Dodatkowo zastosowanie ultradźwięków zmienia niekiedy w sposób zasadniczy wyniki dla danej serii. Generalnie obserwuje się raczej niską aktywność LDH i głównym czynnikiem wpływającym na jej wzrost jest stężenie zastosowanej dawki. Autorka doszukuje się pewnych korelacji pomiędzy cytotoksycznością i witalnością a stosunkiem ilości miejsc kwasowych do zasadowych, pH suspensji, potencjałem zeta i innymi wyznaczonymi wielkościami. Jednak są to raczej dalekie korelacje i na ich podstawie trudno o jasny i prosty wniosek co do wpływu danego parametru na te wielkości.

W kolejnym rozdziale przedstawiona jest charakterystyką układów nanorurka-lek. Badania prowadzono z wykorzystaniem nanorurek aktywowanych w temperaturze 493K. Przedstawiono krzywe TG układów uzyskanych w wyniku adsorpcji fizycznej oraz sprzężenia kowalencyjnego leku do nanorurki. Wyznaczone zawartości leków przedstawione w Tabeli 11 wrastają od C1 do C3, przy czym dla C3 procent masy leku w układzie przekracza 20%. Wynika to jednakże z dużej masy molowej substratu C3 i tym samym ciekawsze i bardziej obrazowe byłoby przeliczenie zawartości leku w stosunku do formy niezawierającej ligandów opuszczających gdyż taka forma cząsteczki powinna występować w układzie nanorurka-lek.

Przy pomocy mikroskopii HRTEM zidentyfikowano klastery leków na powierzchni nanorurek w układach otrzymany metodą adsorpcji. Natomiast próbki w których lek przyłączany był kowalencyjnie nie wykazują obecności większych ugrupowań na powierzchni nanorurek. Obecność platyny w próbkach jest jednak potwierdzona na widmach EDX. Analiza izoterm adsorpcji azotu (Rys. 80 - błędnie cytowany w tekście jako Rys. 90) i konkluzje z nich wynikające są jednak nieco zbyt daleko idące. Raczej nie da się udowodnić chemicznego wiązania cząsteczek leku na podstawie izoterm adsorpcji azotu a taki wniosek pada. Również nie widzę zaniku histerezy dla próbek z zaadsorbowanym fizycznie lekiem.

Przedstawione na Rys. 82 widma IR dla układów z fizycznie zaadsorbowanym lekiem potwierdzają istnienie charakterystycznych pasm dla cisplatyny. Brak jest natomiast odpowiednich danych dla układów w których postuluje się chemiczne wiązanie leku z nanorurką. Również nie podano wyników badań IR dla form C2 i C3 zarówno w przypadku fizycznego jak i chemicznego przyłączenia leku. Tego typu wyniki zwykle należą do kluczowych i należy w trakcie obrony wyjaśnić powody dla których tak istotne dane nie zostały zamieszczone w pracy.

Przedstawione krzywe uwalniania leku zdają się potwierdzać konkluzje Autorki co do miejsca lokalizacji leku. Krzywa dla C1 adsorbowanej w środowisku wodnym ma kształt

typowy dla procesu dyfuzji jednowymiarowej zatem C1 lokuje się we wnętrzu nanorurki. Natomiast krzywa dla adsorpcji C1 w DMF to praktycznie zależność eksponencjalna świadcząca o tym, że szybkość procesu jest proporcjonalna wyłącznie do ilości nieuwolnionych jeszcze cząsteczek.

Przedstawiona w kolejnym rozdziale charakterystyka układu z przyłączonym przeciwciałem CD133 potwierdza, że układy te mają zdolność do wykrywania i przyłączania się do komórek wykazujących ekspresję antygenu CD133. Przyznam, że nie jestem w tej dziedzinie ekspertem i przedstawione na Rys. 88 wyniki cytometrii przepływowej są dla mnie mało zrozumiałe. Gdyby opisy osi były nieco mniej enigmatyczne to być może udałoby się powiedzieć nieco więcej o tych wynikach.

W kolejnym rozdziale następuje opis wyników badań *in vitro* na czterech liniach komórkowych czerniaka. Analizowany jest wpływ samych nośników A0-o-493 na żywotność komórek nowotworowych. Dla stężeń w zakresie 10-150 $\mu\text{g/ml}$ nie obserwuje się znaczącego efektu cytotoksycznego samych nośników. Następnie Autorka podaje wyniki testów żywotności komórek CRL 1872 w obecności różnych form badanych cytostatyków. Badane są różne stężenia zarówno w odniesieniu do samych cząsteczek Cx oraz ich kompleksów z nanorurkami. Niejasne jest jak definiowane jest stężenie gdyż to samo stężenie (w $\mu\text{g/ml}$) czystej formy Cx i Cx przyłączonego do CNT to w istocie zupełnie różne dawki substancji czynnej. Generalnie we wszystkich kombinacjach obserwuje się efekt cytotoksyczny badanych układów, czasami nasilony względem substancji czystej Cx czasami osłabiony. Z braku ścisłej definicji stężenia nie wiemy czy osłabiony efekt działania A0-o-C1-chem w stosunku do C1 jest wynikiem mniejszej ilości platyny wprowadzonej do próbki czy też działanie cisplatyny sprzężonej chemicznie z nanorurką węglową jest słabsze. Tabela 11 informuje, że zawartość C1 w A0-o-C1-chem to tylko 6% więc wynik dla C1 o stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ powinien odpowiadać w przybliżeniu próbce A0-o-C1-chem o stężeniu 250 $\mu\text{g/mol}$. A zatem uzyskano by pożądaną aktywność cytotoksyczną przy znacznym zmniejszeniu stężenia składnika aktywnego. Bardzo ciekawym wynikiem jest nasilony efekt cytotoksyczny formy C3 w stosunku do standardowej C1.

Zwiększona aktywność form w których lek przyłączany jest do nanorurki wskutek adsorpcji fizycznej niekoniecznie powinien być widziany jako wynik pozytywny. Szybkie uwalnianie leku z tego typu formy (Rys.83) oznacza, że praktycznie natychmiast po podaniu cząsteczki Cx pojawią się w organizmie w formie identycznej jak po podaniu samego leku. Dlatego, w mojej ocenie, najwartościowsze są wyniki uzyskane dla form sprzężonych chemicznie. Charakteryzują się one małą zawartością czynnika cytotoksycznego lecz mimo to wykazują długoczasową aktywność (Rys. 90-92). Zatem, obserwowane długie czasy LT50 (Rys.93) dla tych form nie są w istocie wynikiem negatywnym.

Wyniki badań *in vivo* na modelu zwierzęcym potwierdzają udaną próbę stworzenia układu celowanego dostarczania leku do komórek nowotworowych wykazujących ekspresję

antygeny CD133. Spośród badanych układów najbardziej obiecujący okazał się układ transportujący formę C3 ze względu na wysoką aktywność w stosunku do komórek nowotworowych i najniższą cytotoksyczność względem komórek zdrowych. Ciekawe byłoby zbadanie zawartości chemioterapeutyków w obrębie guza po śmierci zwierzęcia i porównanie efektywności terapii celowanej przy użyciu CD133 względem układów nie zawierających tego przeciwciała.

6. Podsumowanie

Rozprawa doktorska pani mgr Karoliny Werengowskiej-Ciećwierz pod tytułem „*Nanorurki węglowe w celowanej terapii przeciwnowotworowej*”, przygotowana pod kierunkiem Prof. dr hab. Artura P. Terzyka oraz dr Marka Wiśniewskiego (jako promotora pomocniczego) stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz świadczy o dużej wiedzy ogólnej Autorki w dziedzinie nauk chemicznych i biochemicznych. Rozprawa potwierdza też umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez Autorkę. Wyczerpuje to wymagania art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 Nr 65, poz. 595; z późn. zm.). Wnioskuje zatem o dopuszczenie pani mgr Karoliny Werengowskiej-Ciećwierz do kolejnych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk chemicznych.

Po wnikliwym przestudiowaniu pracy z trudem znalazłem tylko kilka słabszych punktów o których wspomniałem wyżej. Zatem, z uwagi na ponadprzeciętny poziom przeprowadzonych badań oraz ogromne praktyczne znaczenie uzyskanych wyników wnoszę o wyróżnienie pracy przez Radę Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.



dr hab. Tomasz Pańczyk, prof. IKIFP7