Politechnika Śląska
UCZELNIA BADAWCZA
INICJATYWA DOSKONAŁOŚCI

Wydział Chemiczny
Katedra Fizykochemii i Technologii Polimerów

prof. dr hab. inż.
Dorota NEUGEBAUER

Gliwice, 21.12.2021 r.

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Janik-Hazuka
pt.: *Wielofunkcyjne nanokapsuły polisacharydowe jako platformy teranostyczne*
Praca wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.
Promotor: prof. dr hab. Szczepan Zapotoczny

Polimery naturalne, tj. celuloza i kauczuk, zapoczątkowały rozwój chemii związków wysokocząsteczkowych, która początkowo skupiała się na ich modyfikacjach, a następnie syntezie szerokiej grupy makrocząsteczek o różnorodnych właściwościach. W latach 90-tych wzrosło zainteresowanie wykorzystaniem polimerów do celów biomedycznych, co wiązało się m.in. z intensyfikacją badań nośników polimerowych, które na początku obecnego stulecia ewaluowały jako materiały inteligentne i wielofunkcyjne łącząc funkcje użyteczne w terapii i diagnostyce. Wymagania, takie jak biozgodność i nietoksyczność wobec zdrowych komórek, poprawa rozpuszczalności związku (tj. lek, terapeutyk, środek kontrastujący, marker fluorescencyjny), ograniczenie niepożądanych efektów ubocznych, poprawa farmakodynamiki i farmakokinetyki, stały się podstawą rozwoju badań układów polimerowych ukierunkowanych na kontrolowany i/lub docelowy transport.

Zagadnienia podjęte w rozprawie doktorskiej przez mgr Małgorzatę Janik-Hazuka bardzo dobrze wpisują się w tematykę projektowania wielkocząsteczkowych nośników przyjmujących formę nanokapsułek typu rdzeń-korona z polisacharydową powłoką i olejowym wypełnieniem zawierającym enkapsulowany związek hydrofobowy o charakterze terapeutycznym i/lub diagnostycznym. Tego typu nanostruktury wykazują podobieństwo do liposomów, które są naturalnymi kapsułkami zawierającymi fazę wodną zamkniętą w otoczce dwuwarstwowej odpowiadającej strukturze błony biologicznej. Do ich przygotowania Doktorantka użyła biopolimerów, tj. kwas hialuronowy i/lub chitozan, które modyfikowała hydrofobowymi łańcuchami alkilowymi i/lub ligandami ukierunkowującymi. W celu uzyskania większej stabilności nanokapsuł dodawała jedną lub dwie warstwy techniką warstwa po warstwie (LbL). Obok podstawowej charakterystyki fizykochemicznej wykazała ochronne właściwości powłoki polimerowej przed ewentualnym szkodliwym działaniem środowiska zewnętrznego, zaś mając na uwadze przyszłe zastosowania terapeutyczno-diagnostyczne przeprowadziła testy *in vitro* na normalnych i chorobowych liniach komórkowych oraz *in vivo* z udziałem wybranej grupy szczurów.

Wydział Chemiczny
Katedra Fizykochemii i Technologii Polimerów

prof. dr hab. inż.
Dorota NEUGEBAUER

Rozprawa ma układ standardowy, obejmuje 191 stron, na które składają się: *Zestawienie stosowanych skrótów* (2 strony), *Koncepcja pracy* (2 strony), *Wstęp teoretyczny* (43 strony), *Materiały i metody* (26 stron), *Wyniki badań i dyskusja* (83 strony), *Podsumowanie* (5 stron), *Wykaz dorobku naukowego* (3 strony) oraz *Literatura* (15 stron).

Wstęp teoretyczny Autorka rozpoczęła od ogólnego zagadnienia polimerów i ich podstawowych klasyfikacji, po czym omówiła grupę polisacharydów, w tym kwas hialuronowy i jego udział w różnych nanostrukturach. W nawiązaniu do nanostruktur kolejny rozdział dotyczył charakterystyki nośników polimerowych, a w szczególności metod pozwalających na określenie podstawowych parametrów fizykochemicznych, takich jak rozmiar, potencjał dzeta i efektywność enkapsulacji, oraz przedstawienia podstawowych badań biologicznych. Zgodnie z literaturą naukową najbardziej popularne są badania struktur liposomalnych i lipidowych, które jednocześnie są zaliczane do klasy związków o wysokiej wydajności translacyjnej i niskim sukcesie klinicznym, wskazując na potrzebę rozwoju tej grupy nośników. Z kolei poruszone w dalszej części zagadnienia o charakterze biochemicznym, takie jak biodystrybucja w organizmie podkreślają niebezpieczeństwo występowania efektów ubocznych, np. interakcje ze składnikami krwi czy tworzenie zakrzepów, które mogą być zminimalizowane poprzez odpowiednią strukturę nośnika polimerowego. W przypadku polisacharydów znane są oddziaływania z enzymami, które mogą powodować przedwczesną degradację nośnika i tym samym zakłócić jego efektywne działanie. Struktura nośnika może także wpływać na mechanizm transportu do komórek, pasywny *vs* celowany wymagający szczególnej funkcyjności polimeru, np. wprowadzenia ligandu rozpoznawanego przez określony receptor w komórce. Ciekawym przykładem jest kwas hialuronowy, który ze względu na strukturalny charakter ligandu może uczestniczyć w mechanizmie *podwójnego celowania*, jeżeli dodatkowo zostanie sfunkcjonalizowany drugim ligandem, np. kwasem foliowym. Podobnie, mechanizm uwalniania, kontrolowany *vs* niekontrolowany, opisywany za pomocą różnych matematycznych modeli kinetycznych, może być dopasowany już na etapie projektowania struktury nośnika, który w przypadku polisacharydów polega na enzymatycznej degradacji. Dwa ostatnie podrozdziały Wstępu poświęcone są zagadnieniom obrazowania metodą rezonansu magnetycznego (MRI) i teranostyki. Odnośnie diagnostyki MRI Autorka zwraca szczególną uwagę na grupę perfluorowanych węglowodorów, zarówno liniowych jak i cyklicznych, które mogą być enkapsulowane wewnątrz lub wiązane chemicznie na powierzchni nośnika. Pomimo znaczącej niedogodności, jaką jest ich duża hydrofobowość, która zmniejsza biodostępność tych związków, to dostrzega potencjał ich wykorzystania jako czynniki kontrastujące dostarczane w formie nośników polimerowych. Z kolei zaprojektowanie układu łączącego funkcje diagnostyczne z terapeutycznymi, który umożliwia monitorowanie miejsca i kinetyki uwalniania leku oraz odpowiedzi komórek na jego działanie, wiąże się z pewnymi wymogami i oczekiwaniami, tj. niskie stężenie środka kontrastującego przy zachowaniu właściwości obrazowania, ale duża zawartość leku warunkująca efektywną terapię. Wielofunkcyjne platformy teranostyczne obok środka terapeutycznego i kontrastującego zawierają jeszcze inne składniki, tj. ligand ukierunkowujący i przeciwciała jako czynniki sygnalizujące, które umożliwiają obrazowanie, chemioterapię, działanie hipertermiczne i fotodynamiczne.

Wydział Chemiczny
Katedra Fizykochemii i Technologii Polimerów

prof. dr hab. inż.
Dorota NEUGEBAUER

Doktorantka opracowała przegląd literaturowy na podstawie 375 pozycji, co wskazuje na jej bardzo dobre teoretyczne przygotowanie do prowadzenia prac eksperymentalnych, zaś niewielka liczba cytowanych artykułów opublikowanych przed 2000 rokiem (~13%) świadczy o aktualnym charakterze podjętego zagadnienia, które stanowi popularny trend badawczy w zakresie chemii polimerów.

W części poświęconej omówieniu wyników pracy badawczej poruszono kilka wątków:

i) modyfikacja polisacharydów i przygotowanie nanokapsuł o różnym rodzaju otoczki, tj. kwas hialuronowy vs chitozan, monowarstwa vs bi- & triwarstwa, wypełnienie olejowe (7 rodzajów);

ii) nanokapsuły funkcjonalizowane ligandami ukierunkowującymi, tj. kwas fioliowy vs biotyna vs mannoza, do terapii celowanej;

iii) nanokapsuły funkcjonalizowane perfluorowanym łańcuchem alkilowym (FC10) z enkapsulowanymi perfluorowanymi węglowodorami (nonan, bromooktan, eter koronowy 15C5) jako środkami kontrastującymi do celów diagnostycznych;

iv) enkapsulacja czynników fluorescencyjnych: czerwień Nilu (badania ilościowej oceny wychwytu barwnika do komórek, badania degradacji enzymatycznej), kurkumina (badania stabilności kapsuł wobec pepsyny i niskiego pH, badania efektu hipotensyjnego), rodamina (znacznik fluorescencyjny);

v) enkapsulacja związków bioaktywnych (di- & trisiarczek diallilu) i leków przeciwnowotworowych (fulwestrant, winorelbina, palbocyklib, lapatinib, baikaleina, ewerolimus, formononetyna, sylibinina, paklitaksel);

vi) kapsuły jako układy synergistycznego działania leków w celu wzmocnienia efektu terapeutycznego.

W pierwszej kolejności Doktorantka potwierdziła strukturę zmodyfikowanych polisacharydów i określiła stopień podstawienia przy użyciu różnych metod analitycznych (analiza elementarna, FT-IR, NMR, UV-vis, miareczkowanie konduktometryczne, test HABA/Avidin, obliczenia teoretyczne) ze względu na charakter otrzymanych produktów. Następnie otrzymane układy kapsułkowe poddano podstawowej charakterystyce fizykochemicznej w celu wyznaczenia średnicy hydrodynamicznej i potencjału dzeta. Parametry te wyznaczono standardowo za pomocą pomiarów DSC określając korelację ze strukturą polisacharydu czy rodzaju enkapsulowanego związku, jak również sprawdzono stabilność kapsuł badając systematycznie przez 12 tygodni próbki emulsji, które nie wykazały większych zmian. Bardziej szczegółowa analiza pomiarów Turbiscan prowadzonych dla trzech obszarów próbki w wodzie z różnym stężeniem soli lub PBS potwierdziły stabilność emulsji, przy czym zaobserwowano niewielkie zmiany w dolnej części układu PBS i nieliniową zależność od stężenia soli w wodzie, gdzie dynamika dla poszczególnych obszarów zależy od siły jonowej i rdzenia kapsuł, a korzystny efekt dla kapsuł wypełnionych olejem o większej lepkości wzrastał wraz z długością łańcucha alkilowego i jego stężenia. Podobnie wnioski uzyskano z pomiarów tensjometrycznych napięcia międzyfazowego na granicy wodnego r-ru polisacharydu i oleju. Pokrywanie kapsuł kolejną warstwą/warstwami powodowało zmianę potencjału dzeta ze względu

na ich charakter. Pod względem morfologicznym nanokapsuły posiadały regularny, sferyczny kształt i gładką powierzchnię, co jest korzystne podczas migracji do wnętrza tkanek.

Ze względu na dedykowane zastosowania medyczne druga część dotyczy badań biochemicznych *in vitro* na wybranych liniach komórkowych, tj. NMuMG (mysie komórki gruczołu sutkowego niezmienione nowotworowo) oraz 4T1 (mysie nowotworowe komórki gruczołu sutkowego), B16-F10 (mysie nowotworowe komórki skóry – czerniak) i CaCO-2 (ludzkie nowotworowe komórki jelita grubego – okrężnicy, gruczolakorak jelita grubego). Podstawowe testy cytotoksyczności, tj. XTT oraz wychwyt czerwieni obojętnej do lizosomów żywych komórek, zastosowano w celu określenia przeżywalności komórek jako ocena efektywności działania układu. Ponadto wyznaczono indeks terapeutyczny definiujący wartość stężenia stosowanego układu, która powoduje spadek przeżywalności komórek do 50%. Na podstawie testu zarysowania oceniono wpływ na stopień migracji komórek, zaś mikroskopia konfokalna posłużyła do badania internalizacji kapsuł do komórek. Ze względu na różny sposób dozowania, doustne vs dożylne, a tym samym nieunikniony kontakt z płynami ustrojowymi, potwierdzono brak oddziaływania nanokapsuł z symulowanym sokiem trawiennym, tj. r-r z pepsyną o pH=1,8 oraz dla porównania r-r amylazy i lipazy o pH=7,4, i surowicą krwi. Podobnie wykluczono degradujące działanie warunków utleniających i hemolizę. Wykonane zostały także badania *in vivo* na grupie szczurów z nadciśnieniem, które potraktowano kapsułkami z kurkuminą wykazując działanie hipotensyjne, a jednocześnie badania *ex vivo* potwierdziły jej dostarczenie do organów za pomocą ^{19}F MRI.

Spośród badanych układów najbardziej obiecujące ze względu na efektywność przeciwnowotworową okazały się te dostarczające winorelbinę, lapatinib, formononetynę czy paklitaksel, chociaż nadal wymagają dalszych badań nad zwiększeniem ich skutecznego działania. Dodatek drugiego leku w celu uzyskania układu o działaniu synergistycznym (paklitaksel/ formononetyna w różnych proporcjach wagowych) spowodował niewielki wpływ na spadek przeżywalności komórek (~10%). Użyte w badaniach polisacharydy są dogodnym materiałem do terapii celowanej, gdyż jako źródło energii są wychwytywane przez komórki nowotworowe poprzez oddziaływanie z receptorami ulegającymi nadekspresji. Modyfikacja polisacharydów cząsteczkami sacharydów czy też innymi ligandami, które pełnią funkcję czynników umożliwiających transport układu dostarczania leków do określonego celu, miała wzmocnić ten efekt. Jednak funkcjonalizacja mannozą, kwasem foliowym lub biotyną nie przyniosła oczekiwanych rezultatów, chociaż wpłynęła na kinetykę internalizacji nośników do komórek.

Otrzymane przez Doktorantkę wyniki wskazują na duży potencjał badanych materiałów polimerowych ze względu na stabilność, możliwość odpowiedniej modyfikacji czynnikami docelowymi i/lub diagnostycznymi oraz zdolności do transportowania związków biologicznie aktywnych, co przedstawiono w szczególności na przykładzie leków przeciwnowotworowych. Jak sama Autorka przyznaje układy te wymagają dalszych badań, aby zwiększyć ich efektywność działania, co może być dokonane przez odpowiednią strukturę polimeru, w tym przypadku tworzącego powłokę nanokapsuły oraz dobór jej wypełnienia, w którym ma rozpuszczać się

Wydział Chemiczny
Katedra Fizykochemii i Technologii Polimerów

prof. dr hab. inż.
Dorota NEUGEBAUER

enkapsulowany lek. Sposób przedstawienia badań i interpretacja wyników nie budzą zastrzeżeń merytorycznych, chociaż niektóre zagadnienia wymagają uzupełnienia lub wyjaśnienia:

1) Trudno jest zgodzić się ze stwierdzeniem na str. 26, że *micele polimerowe to samoorganizujące się pęcherzyki*, gdyż sugeruje ciekłe wypełnienie, które jest charakterystyczne dla nanokapsuł, a przecież micela różni się kapsuły. Zatem na czym polega zasadnicza różnica między tymi superstrukturami?

2) Pojawiają się zamiennie sformułowania *rozpraszanie cząstek* i *rozpraszanie cząsteczek*. Kiedy można używać pojęcia cząstka, a kiedy cząsteczka?

3) Nie bardzo wiadomo jak należy rozumieć zestawienie metod ultrawirowania, dializy, itd. z metodą porównawczą NMR do wyznaczenia efektywności enkapsulacji (EE, str. 31). Te pierwsze służą do oddzielenia enkapsulowanego leku, a metoda NMR ma charakter jakościowy, zaś wyznaczenie EE opiera się na metodach ilościowych, które *de facto* nie są podane w rozdz. 2.2.1.3.

4) Na str. 51 omówiony jest perfluorowany polieter PFPE, którego struktura jest podana na rys. 17, gdzie jednak podpisany jest jako poliester, podobnie w wykazie skrótów jest przedstawiony jako poliester.

5) W części eksperymentalnej jest wspomniane, że użyto chitozan LMW, co jest pojęciem względnym, poza tym należałoby podać stopień deacetylacji.

6) Czy układ zmodyfikowany krótszymi łańcuchami alkilowymi nie byłby lepiej rozpuszczalny w r-rze wodnym i dogodniejszy do modyfikacji biotyną?

7) W jakim stopniu nastąpiło przyłączenie jednostek substancji ukierunkowujących?

8) Dlaczego do badań *in vivo* użyto PFOB chociaż badania enkapsulacji wykazały największą efektywność dla PFN?

9) Praca obejmuje szeroki zakres badań biologicznych, jednak pewien niedosyt pozostawia brak badań kinetyki procesu uwalniania.

Generalnie rozprawa jest napisana językiem poprawnym, chociaż Autorce nie udało się uniknąć takich błędów jak: skróty myślowe (np. średnica str. 103, film str. 13, sygnały fluorów str.86); niewprowadzone lub podwójne skróty (np. DDS, Hy vs HA); niefortunne sformułowania ((nano)cząstki lub NPs str 25, zmierzenie rozmiarów str, 29, wyższa hydrofobowość str.86); czy też wprowadzanie cytowań (np. na podstawie[90] str. 30, etc). Ponadto, warto byłoby przypomnieć podstawowe zasady nazewnictwa polimerów (poli(etylenoimina), a powinno być zapisane tak jak polietylen, zaś wyjaśnienie skrótu PMATIB wymaga nawiasu po przedrostku *poli*, PLGA - kopolimer kwasu polimlekowego i kwasu glikolowego, zamiast kopolimer kwasu mlekowego i kwasu glikolowego lub poli(laktyd-*ko*-glikolid).

Zakres wykonanej pracy badawczej przez Doktorantkę, tj. różnorodna modyfikacja biopolimerów i przygotowanie na ich bazie kilku rodzajów nanokapsuł wraz z enkapsulacją różnej klasy związków, po czym charakterystyka fizykochemiczna i szeroko pojęta charakterystyka biochemiczna, w tym testy *in vitro*, *in vivo* i *ex vivo*, wymagały interdyscyplinarnej wiedzy teoretycznej i umiejętności preparatywnych. Pani mgr Janik-Hazuka wykazała się znajomością różnorodnych technik analitycznych na podstawie, których potrafiła opracować wyniki zarówno w zakresie chemii polimerów, jak i biochemii.

Na dorobek naukowy Doktorantki składa się 1 patent i 7 publikacji w czasopismach z listy filadelfijskiej o zasięgu międzynarodowym (IF: 4,329-7,790), w tym 5 obejmuje zagadnienia związane z tematyką pracy doktorskiej, gdzie w dwóch z nich Pani Małgorzata jest pierwszym autorem. Na uwagę zasługuje fakt, że Autorka niniejszej rozprawy swoją pracę doktorską realizowała w ramach dwóch grantów badawczych, tj. Diamentowy Grant i Preludium. Jej aktywność konferencyjną potwierdzają zaprezentowane postery (8) oraz wygłoszone w jęz. polskim lub jęz. angielskim komunikaty (6). Doktorantka odbyła także roczny staż naukowy w Zakładzie Zaburzeń Krzepnięcia Krwi na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi, co niewątpliwie przyczyniło się do profesjonalnego rozwinięcia prowadzonych badań.

Podsumowując, przedstawioną do recenzji pracę doktorską oceniam wysoko, Autorka podjęła się z zadowalającym efektem zaprojektowania nanokapsułek z otoczką wybranych polisacharydów odpowiednio funkcjonalizowanych pod kątem wielofunkcyjnych układów dostarczania leków w terapii celowanej i/lub o potencjalnych właściwościach teranostycznych. Recenzowana praca spełnia kryterium nowości naukowej, co zostało udokumentowane artykułami opublikowanymi w prestiżowych czasopismach o wysokich wskaźnikach wpływu. Na tej podstawie stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia wymagania „Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym..." z dnia 18 marca 2011 r i wnioskuję o dopuszczenie mgr Małgorzaty Janik-Hazuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie uważam, że poziom naukowy i jakość ocenianej rozprawy doktorskiej charakteryzującej się wielowątkowością i dodatkowo zrealizowanej w stosunkowo krótkim okresie 4 lat zasługują na wyróżnienie, o które wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne na Uniwersytecie Jagiellońskim.

Neugebauer D.