

## Wydział Inżynierii Metali i Informatyki Przemysłowej

### KATEDRA METALOZNAWSTWA I METALURGII PROSZKÓW Centrum Mikroskopii Elektronowej dla Inżynierii Materiałowej

dr hab. inż. Urszula Stachewicz, Prof. AGH

Tel. +48 12 617 52 30;

e-mail: [ustachew@agh.edu.pl](mailto:ustachew@agh.edu.pl)

website: <http://biocom4saven.agh.edu.pl/>

Kraków, 28 listopada 2021 r.

### Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Kaczyńskiej, pt.:  
„Nanocząstki polimerowe i hybrydowe do zastosowań biomedycznych”  
wykonanej na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie, Wydziale Chemii,  
pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Nowakowskiej.

#### 1. Charakterystyka pracy doktorskiej

Praca doktorska Pani mgr Agnieszki Kaczyńskiej zawiera wyniki badań związane z otrzymaniem i charakteryzacją właściwości fizykochemiczne nanocząstek superparamagnetycznych opłaszczonych ultracienkimi warstwami polimerowymi służących do obrazowania wczesnych zmian zapalnych śródbłonna a także nanocząstek do kontrolowanego dostarczania leków.

Główny cel pracy został jasno określone jako **otrzymanie nowych nanocząstek hybrydowych i polimerowych do zastosowań biomedycznych w terapii celowanej, hipertermii i onkologii**, a cele szczegółowe następująco:

- otrzymanie superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (SPIONs) pokrytych jonowymi pochodnymi chitozanu z przyłączonym przeciwciałem monoklonalnym, przydatnych do monitorowania, za pomocą MRI, bardzo wczesnych etapów zmian zapalnych śródbłonna naczyń krwionośnych, będących pierwszym etapem wielu chorób układu krążenia

- otrzymanie dwufunkcyjnego hybrydowego układu złożonego z superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (SPION) i kurkuminy do zastosowań w hipertermii przeciwnowotworowej, a także jako nanonośnik kurkuminy umożliwiającym jej celowane dostarczanie
- otrzymanie i scharakteryzowanie termoczułych nanonośników polimerowych, zbudowanych z kationowej pochodnej kurkuminy (C-KUR) i anionowej pochodnej hydroksypropylocelulozy (A-HPC), służących do dostarczania piroksykamu.

Rozprawa doktorska obejmuje 162 stron i składa się z 6 rozdziałów: 3 w części literaturowej i 3 w części doświadczalnej. Ponadto Doktorantka umieściła na początku streszczenie pracy w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów. Na końcu pracy zawarte jest podsumowanie i dorobek naukowy Doktorantki. Praca posiada 51 rysunków i 6 tabel, a bibliografia zawiera 206 pozycji.

Część literaturowa zawiera wprowadzenie w tematykę badawczą, w tym informacje na temat wyzwań współczesnej biomedycyny, zwłaszcza teranostyki i diagnostyki, oraz terapii celowanej w systemach dostarczania leków. Podkreśla w tej części znaczenie wykorzystania układów/systemów do kontrolowanego dostarczania leków tzw. DDS, ang. Drug Delivery System, ich drogi ich dostarczania i efektów terapeutycznych. Tutaj właśnie zostały dokładnie opisane formy podawania leku od koniugat, które składają się z nośnika i substancji aktywnej, po nanorurki węglowe, dendrymery, liposomy, polimerosomy, micelle, hydrożele, wektory wirusowe i niewirusowe, materiały hybrydowe oraz funkcjonalizacje SPION. Szeroko i dokładnie został przedstawiony stan wiedzy dotyczący nanocząstek tlenku żelaza oraz sposobu modyfikacji ich powierzchni.

W dalszej części zaprezentowane zostały polimerowe do zastosowań biomedycznych, w tym samoorganizujące się układy polimerowe oraz leki stosowane w układach hybrydowych i polimerowych: piroksykam i kurkumina. Następnie dokładnie omówione zostały piroksykam i kurkumina, i ich działanie. Jednak jak sama Autorka zaznacza, dostarczenie piroksykamu jest wyzwaniem ze względu na jego niską rozpuszczalność w roztworze wodnym i powolne wchłanianie, co opóźnia działania przeciwzapalne i przeciwbólowe. Z tego względu nadal istnieje potrzeba polepszenia biodostępności i zmniejszenia efektów ubocznych w metodach dostarczania piroksykamu. Podobnie jest w przypadku kurkuminy, której biodostępność po podaniu doustnym jest bardzo słaba. Kurkumina ma silne własności przeciwzapalne i przeciwutleniające i od wielu lat jest stosowana do leczenia trudno gojących się ran i stanów zapalnych różnych narządów, a także stosuje się ją przy dolegliwościach wątroby oraz przewodu pokarmowego.

Autorka w jasny sposób przedstawia znaczenie swoich badań w kontekście już innych metod stosowanych do dostarczania leków i otrzymywania nanocząstek. W mojej ocenie zakres przeglądu literatury został dobrany trafnie i rzetelnie przedstawiony, w związku z

czym Doktorantka jasno sformułowała cele pracy i zaplanowała badania eksperymentalne. Szeroki i bardzo dobrze zestawiony opis literatury pozwolił Doktorantce w dalszej części pracy przeprowadzić przejrzystą dyskusję otrzymanych wyników.

Część doświadczalna składającej się z 3 rozdziałów:

- 1) Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza z przyłączonym przeciwciałem
- 2) Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza z przyłączoną kurkumina
- 3) Nanocząstki polimerowe jako nośniki piroksykamu.

Każdy z powyższych rozdziałów podzielony został na wstęp i szczegóły eksperymentalne: materiały, aparatura, metody badawcze, preparatyka i uzyskane wyniki oraz wnioski.

Rozdział 1 opisuje część badań nad otrzymaniem superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza pokrytych jonowymi pochodnymi chitozanu z przyłączonym przeciwciałem monoklonalnym, o potencjalnym zastosowaniu jako selektywne kontrasty MRI skracające czas relaksacji T2. Układ ten może znaleźć zastosowanie w obrazowaniu wczesnych zmian zapalnych śródbłonna spowodowanych m. in. miażdżycą, cukrzycą, przerzutami raka. Uzyskany układ cząstek SPION-CCh-anty-VCAM-1 ma rozmiary poniżej 200 nm i wykazuje właściwości superparamagnetyczne. Ich namagnesowanie w temperaturze 3 K nasyca się i wynosi 26 emu/g. Wartość ta zmniejsza się nieznacznie wraz ze wzrostem temperatury, aby osiągnąć 21 emu/g w temperaturze 300 K. Przyłączenie przeciwciał do cząstek SPION-CCh nie ma znaczącego wpływu na ich właściwości magnetyczne. Właściwości superparamagnetyczne zostały też potwierdzone za pomocą pomiarów widm mössbauerowskich, a ich wizualizacje potwierdziły pomiary MRI. Doktorantka zaznaczyła, że pożądane są jeszcze badania *in vivo* lub *ex vivo* i dokonanie korelacji badań biologicznych z wynikami uzyskanymi przy użyciu techniki MRI.

Rozdział 2 opisuje otrzymanie superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza pokrytych warstwą polimerową z przyłączoną kurkumina, potencjalnie przydatnych w leczeniu nowotworów metodą hipertermii będących jednocześnie nośnikami modelowego leku jakim jest kurkumina. SPION-CCh-AA-Cur nanocząstki mają wymiary ok. 50 nm, co zostało potwierdzone pomiarami TEM i SAXS. Natomiast pomiary FTIR i XPS, uzupełnione analizą TGA, potwierdziły obecność dwóch warstw polimerowych (CCh i AA-Cur) w syntetyzowanym układzie a pomiary fluorescencji potwierdziły obecność kurkuminy. Wyniki pomiarów VSM pokazały superparamagnetyczne właściwości SPION-CCh-AA-Cur oraz układ odznacza się wysoką wartością SAR wynoszącą 280 W/g. Badania fluorescencji na fibroblastach pozwoliły zaobserwować obecność kurkuminy w SPION-CCh-AA-Cur, w związku z tym układ może mieć potencjalne zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej. Układy te powinny być jeszcze przebadane biologicznie.

W kolejnym rozdziale zostały opisane badania dotyczące otrzymania i scharakteryzowania termoczulych nanośników polimerowych, zbudowanych z kationowej pochodnej kurdlanu (C-KUR) i anionowej pochodnej hydroksypropylocelulozy (A-HPC), służących do dostarczania piroksykamu. Optymalizacja składu układu do otrzymania nanocząstek zostało przeprowadzone przy użyciu techniki DLS na drodze samorzutnej koacerwacji w wodzie. Stosunek wagowy C-KUR/A-HPC wynoszący 1:25 a regularnie kuliste nanocząstki mają średnicę 200 nm, są termoczule i wykazują LCST w 41°C. Wartość LCST jest odpowiednia do zastosowań w hipotermii a profil uwalniania leku z systemu PN-PIX jest prawie liniowy w pierwszych 2 h a po 6 h uwolnione jest 98% zamkniętego piroksykamu. Co ważne, nanocząstki PN-PIX zostały skutecznie wchłonięte przez komórki w ciągu 24 h a opracowany układ PN-PIX jest łatwy w syntezie, ponieważ tworzy się w wodzie w trakcie spontanicznego, natychmiastowego procesu i charakteryzuje się wysoką wydajnością enkapsulacji piroksykamu.

## 2. Ocena pracy

Badania zostały przeprowadzone w sposób systematyczny i staranny. Zaletą pracy jest podjęcie bardzo ciekawej tematyki pracy, której celem było otrzymanie nowych nanocząstek hybrydowych i polimerowych do zastosowań biomedycznych w terapii celowanej, hipertermii i onkologii. Autorka w swojej pracy proponuje bardzo oryginalne i kompleksowe podejście do badań, które wraz z analizą wyników nie budzą wątpliwości i zostały wykonane poprawnie z naukowym podejściem do problemu.

Po przeczytaniu pracy nasuwa się jednak kilka uwag, przedstawionych w poniżej w punktach:

1. Opisy aparatury i metod badawczych w sekcjach 1.2.2, 2.2.2 i 3.2.2 powinny zawierać więcej szczegółów, na przykład przygotowanie próbek pod SEM i parametry obrazowania, które są niezwykle ważne przy materiałach czułych na wiązkę elektronów.
2. Skrótów zostały przedstawione na wstępie pracy, zatem nie jest konieczne ich rozwijanie w każdej sekcji metod. Niektóre skrótów są pominięte na liście, na przykład AFM i XPS.
3. Odnośnie pomiarów potencjału zeta nanocząstek w opisie metody nie jest podane w jakim roztworze został pomierzony i przy jakich parametrach. Jaka jest zależność potencjału zeta od pH roztworu? Czy pomiary dla badanych nanocząstek mogą być wykonywane w SBF? Dlaczego te pomiary są wykonywane jedynie w wodnej dyspersji?
4. Dlaczego w Tabeli 2, str. 83, podana jest wartość dla SPION-CCh-Ts(0.033g) jest w 'g' a dla pozostałych rodzajów próbek w 'mg'? Czy jest jakaś zależność między wielkością cząstek a ich potencjałem zeta?

5. Pod jakim kątem zostały wykonane pomiary XPS i jaki obszar albo jaka ilość cząstek zostały przeanalizowane?

6. W Tabeli 3 zostały porównane wielkości potencjału zeta dla SPION-CCh i SPION-CCh-AA-Cur różnych pH, 10 i 6. Czy w tym przypadku potencjał zeta nie zależy od pH?

7. Na stronie 130 w uzyskanych wynikach, sekcja 3.3, Doktorantka napisała: „Analiza uzyskanych mikrofotografii SEM wykazała, że wielkość i morfologia zsyntetyzowanych struktur silnie zależała od stosunku wagowego użytych polielektrolitów.” Czy możliwe jest przedstawienie tej zależności na wykresach?

8. Na stronie 137 nie potrzebnie powtarzane są wytłumaczenia symboli przy równaniach 18-20.

Uwagi o charakterze dyskusyjnym i uwagi redakcyjne zawarte w tej recenzji nie wpływają na pozytywną ocenę pracy. Są one wskazówkami przydanymi w dalszym rozwoju naukowo-badawczym Doktorantki.

### 3. Ocena końcowa pracy

Po zapoznaniu się z pracą doktorską i przeanalizowaniu wyników stwierdzam, że cele badawcze zostały bardzo dobrze opisane i rozważone. Praca ta jest świetnym przykładem interdyscyplinarnych badań obejmujących metody wywarzania nanocząstek do celowych terapii i ich charakteryzacji fizykochemicznej, a także odpowiedzi biologicznych. Z tego względu praca powinna zostać wyróżniona, ponieważ obejmuje niezwykle ważne tematy z możliwością zastosowania otrzymanych wyników.

Praca Pani mgr Agnieszki Kaczyńskiej, pt.: „Nanocząstki polimerowe i hybrydowe do zastosowań biomedycznych” zawiera wartościowe wyniki badań i ich dyskusję. Według mojej opinii praca ta spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim, określone ustawą o stopniach i tytułach naukowych. Wnioskuje do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie o przyjęcie rozprawy doktorskiej i o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Kaczyńskiej do publicznej obrony, oraz o wyróżnienie jej pracy.



Urszula Stachewicz