

Kraków, 29 lipca 2015 r.

Prof. dr hab. inż. Jan Chłopek

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA

IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki

Katedra Biomateriałów

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **mgr Gabrieli Kanii**

pt: **"Biokompatybilne, superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza do zastosowań biomedycznych"**

Nowoczesne biomateriały zaliczane do materiałów wielofunkcyjnych w wielu przypadkach umożliwiają wsparcie procesów biologicznych prowadzących do odbudowy i regeneracji wielu tkanek i organów. Spełniają one rolę nie tylko materiałów implantacyjnych, podłoży w inżynierii tkankowej, ale także mogą być wykorzystane w nowych metodach diagnostycznych i terapeutycznych. Te nowe możliwości powiązane są z wykorzystaniem nanocząstek, które stosunkowo prosto można funkcjonalizować powierzchniowo i nadawać im określone właściwości fizykochemiczne i biologiczne. Głównym problemem do rozwiązania jest znalezienie właściwej relacji pomiędzy zdolnością do detekcji zmian zachodzących w różnych tkankach a biogodnością.

Przedstawiona praca doktorska Pani mgr Gabrieli Kanii dotyczy otrzymywania nowych biomateriałów na bazie supermagnetycznych nanocząstek tlenków żelaza (SPION) spełniających rolę środka kontrastującego w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego (MRI). Oprócz głównego celu, podjęto także badania nad funkcjonalizacją powierzchni nanocząstek sondą fluorescencyjną, co otworzyło nowe możliwości w zakresie dwufunkcyjnej diagnostyki obejmującej jednocześnie wykorzystanie mikroskopu fluoroscencyjnego i rezonansu magnetycznego. Podjęto także próbę poprawy biogodności SPIONów z wykorzystaniem pęcherzykowej struktury polimeru, a także poprawy

bioaktywności drogą spełnienia roli nośnika substancji biologicznych. Jednym z celów podjętej tematyki badań było zastąpienie toksycznego materiału magnetycznego, jakim był gadolin, a także wyeliminowanie jako środka kontrastującego supermagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza pokrytych dekstranem.

Do otrzymywania nanocząstek SPION wykorzystano klasyczne metody syntezy chemicznej z dodatkiem polielektrolitów, jakimi były kationowa i anionowa pochodna chitozanu. Autorka w części teoretycznej swojej pracy analizuje możliwe metody otrzymywania SPION, skupiając się głównie na metodach chemicznych. Przedstawiła wady i zalety tych metod. Spośród wielu technik obejmujących elektronolitografię, CVD, MOCVD, pirolizę, metody zol-żel, metody elektrochemiczne, współstrącanie, Autorka w swojej pracy wybrała tą ostatnią. Głównym kryterium wyboru tej metody był niski poziom zanieczyszczeń. Współstrącanie z roztworów wodnych wydaje się być najbardziej efektywną metodą i pozwala otrzymać nanocząstki magnetytu, wykorzystując reakcje chemiczne soli żelaza FeCl_2 i FeCl_3 z zasadą.

Analiza podstawowych założeń i celów wskazuje, że praca ma charakter interdyscyplinarny i lokuje się w obszarach pomiędzy nauką o materiałach, chemią, fizyką i biologią.

W części teoretycznej swojej pracy Autorka analizuje możliwości obrazowania metodą rezonansu magnetycznego, wskazując przede wszystkim na ograniczenia wynikające z zastosowania różnych środków kontrastujących, najczęściej zbudowanych z układów wielowarstwowych. Te wielowarstwowe układy, bazujące głównie na SPION, są stabilizowane poprzez wykorzystanie stabilizatorów organicznych i nieorganicznych. Autorka w dalszej części swojej pracy uzasadnia wybór chitozanu jako środka stabilizującego, wskazując na takie argumenty jak: biogodność, hydrofilowość, biodegradowalność, a przede wszystkim na obecność w strukturze chitozanu grup hydroksylowych i aminowych. Grupy te ułatwiają modyfikację struktury, a przede wszystkim pozwalają sterować rodzajem ładunków na powierzchni. Innym sposobem stabilizacji SPION może być zamykanie nanocząstek tlenków żelaza w pęcherzykach fosfolipidowych lub polimerowych. Wykorzystanie polimerosomów, w zależności od warunków zewnętrznych (pH, temperatura, ultradźwięki, pole magnetyczne, itp.), może mieć wpływ na kinetykę procesu uwalniania biomolekuł, a tym samym spełniać funkcję nośnika leku.

Rozdział 2.4 tej pracy poświęcony jest wielofunkcyjnym SPION w obrazowaniu biomedycznym, w którym przeanalizowano możliwości kombinacji metod diagnostycznych. Dotyczy to na przykład kombinacji obrazowania fluorescencyjnego z obrazowaniem metodą rezonansu magnetycznego, czy rezonansu magnetycznego z ultrasonografią. Wydaje się, że możliwość kombinacji różnych technik diagnostycznych może wpływać na ich czułość i rozdzielczość, zależnych także w dużej części od rozkładu i wielkości nanocząstek, a tym samym prowadzić do opracowania skuteczniejszych metod diagnostycznych, i idąc dalej terapeutycznych.

Nanocząstki tlenku żelaza w MRI są wykorzystywane głównie jako środki kontrastujące negatywne, a więc osłabiające zewnętrzne pole magnetyczne. Ważną cechą tlenków żelaza jest możliwość transformacji do środków pozytywnych drogą sterowania wielkością cząstek. Te same efekty kontroli daje możliwość stosowania powłok chitozanowych jako polikationów i polianionów. Wykorzystanie samoorganizujących się struktur, jakimi są polimerosomy, umożliwia dalszą modyfikację powierzchni nie zmieniając właściwości magnetycznych, a wpływając na właściwości biologiczne, w tym na cytotoksyczność. Konsekwencją takiego podejścia jest zbudowanie wielowarstwowego, wielofunkcyjnego układu hybrydowego, w którym od strony chemicznej połączono nieorganiczny, nanometryczny tlenek żelaza z organicznym polisacharydem, jakim jest chitozan oraz samoorganizującym się polimerosomem na bazie polimerów blokowych. Autorka dla uzyskania takiej złożonej struktury stosuje różne metody otrzymywania.

Osobnego komentarza wymagają wyniki badań właściwości magnetycznych. Autorka przedstawiła krzywą magnetyzacji dla badanego układu porównując ją do wykresu teoretycznego (Rysunek 3). Zależność przedstawiona na rysunku 16 jakkolwiek ma przebieg podobny jak na rysunku 3, jednak zależność ta przedstawiona jest dla temperatury $T=200\text{K}$. Jakże przesłanki decydowały o wyborze tej temperatury?

Istotne jest również dla dalszych badań, że magnetyczność SPION z kationową powłoką chitozanową została potwierdzona za pomocą mikroskopu AFM/MFM. W dalszej części pracy Autorka analizuje zależność stopnia relaksacji poprzecznej od stężenia żelaza w magnetycznych nanocząstkach, przy wartości zewnętrznego pola magnetycznego równej 4,7 T. Przeprowadzone obliczenia wartości relaksacyjności r_2 i r_1 wskazują, że modyfikacja SPION ma korzystną relację r_2 do r_1 . Natomiast nieuzasadnione jest porównywanie tych wartości do komercyjnych środków kontrastujących, ponieważ obliczenia te przeprowadzono przy innej wartości zewnętrznego pola magnetycznego (1,5 T). Ponadto nasuwa się pytanie,

dlaczego zależność relaksacyjności od stężenia żelaza badano przy wartości zewnętrznego pola 4,7 T, podczas gdy stosowane w medycynie wartości pola to 1,5-2,0 T. W przypadku obecności polimerosomów, badania magnetyczne prowadzono przy jeszcze innej wartości zewnętrznego pola magnetycznego, tj. 9,4 T. Stosowanie tak zróżnicowanych warunków pomiaru nie ułatwia interpretacji wyników.

Badania fluorescencji w różnych organach i tkankach pokazały, że modyfikowane nanocząstki nie przedostają się do mózgu, serca, czy śledziony, a więc potencjalnych miejsc mogących wywołać niekorzystne reakcje. W takich organach jak: płuca, nerki, czy wątroba obserwuje się akumulację nanocząstek, część jest wyłapywana przez makrofagi, czego skutkiem są obniżone czasy relaksacji T_2 mierzone do 14 dni po iniekcji. Niezrozumiałe jest stosowanie w badaniach dawki 2,32 mg Fe/kg, skoro nekrozę ogona u myszy obserwowano już przy dawce 1 mg Fe/kg. Badania *in vivo* oraz *ex vivo* wskazują, że proces oddziaływania organizmu z modyfikowanymi nanocząstkami tlenku żelaza jest bardzo złożony, wymagający obserwacji drogi przemieszczania się nanocząstek, ich akumulacji i oddziaływania z poszczególnymi organami. W tym przypadku bardzo istotne jest określenie wpływu morfologii i rozmiaru nanocząstek, stosowanych dawek i warunków magnetyzacji na zachowanie tych cząstek w organizmie żywym. Niepokojącymi wydają się wyniki badań morfologii krwi myszy po iniekcji nanocząstek. Wskazują one, że niektóre składniki modyfikowanych SPION szczególnie związane z chitozanem mogą wykazywać przejściową ostrą toksyczność. Wszystko to sprawia, że opracowanie skutecznego środka kontrastującego dla MRI wymaga dalszych badań nie tylko prowadzących do podwyższenia zdolności detekcyjnych, ale także zapewnienia bezpieczeństwa implantacyjnego.

Niezmiernie istotne rezultaty Doktorantka uzyskała w wykorzystaniu SPION w obrazowaniu zmienionego chorobowo śródbłonna. Zdjęcia naczyń krwionośnych uzyskane metodą mikroskopii konfokalnej wskazują na gromadzenie się nanocząstek w ścianie naczynia, natomiast nanocząstki z sondą fluorescencyjną są obecne w ścianie naczynia ze stanem zapalnym bez gromadzenia się blaszki miażdżycowej. Obserwacja ta może otworzyć drogę do przewidywania tworzenia blaszki, gdzie zdarzenie biochemiczne może wyprzedzać zdarzenie morfologiczne/strukturalne. Innymi słowy tym sposobem będzie można badać naczynia krwionośne i określać potencjalne miejsca tworzenia zakrzepów zamykających światło tętnicy, mogących wywołać zawał serca lub udar mózgu.

Uzyskane w pracy wyniki wskazują na potencjalne możliwości wykorzystania modyfikowanych powierzchniowo SPION jako środka kontrastującego dla obrazowania

metodą rezonansu magnetycznego. Jak podkreśliła Autorka wymagać to będzie dalszych badań, szczególnie w zakresie poprawy biogodności takich wielowarstwowych układów, a także pełnej kontroli nad przemieszczaniem się nanocząstek w organizmie żywym, zarówno na etapie ich podawania jako środka kontrastującego, jak i ich usuwania z krwioobiegu. Niezmiernie istotne w tym przypadku wydają się badania dotyczące korelacji pomiędzy czasem resorpcji badanych związków, a czasem przeprowadzenia pomiarów metodą MRI. Zastosowane w pracy metody badawcze są adekwatne do postawionych problemów i pokazują, że Doktorantka dobrze porusza się w obszarze nanomateriałów, dobierając odpowiednie metody otrzymywania i metody oceny właściwości fizykochemicznych i biologicznych. W tym ostatnim przypadku, analizy prowadzone były w warunkach *in vitro*, *in vivo* oraz *ex vivo*, co z jednej strony pokazało w miarę pełny obraz oddziaływania modyfikowanych nanocząstek z organizmem żywym, ale z drugiej utrudniało interpretację ze względu na złożoność układu i wielość czynników wpływających na oddziaływania biologiczne.

Strona redakcyjna pracy budzi pewne zastrzeżenia zarówno co do układu jak i pewnych niekonsekwencji redakcyjnych gdzie tytuły podrozdziałów raz są numerowane a raz tylko pogrubione.

W podsumowaniu można stwierdzić, że cele tej pracy zostały osiągnięte – zbudowano wielowarstwowy, nanometryczny układ hybrydowy wykazujący właściwości superparamagnetyczne, o stabilnej dyspersji nanocząstek, z podwyższoną biogodnością, a także możliwością funkcjonalizacji sondą fluorescencyjną, a poprzez obecność polimerosomów wykazujący także zdolność do transportu leków. Pomimo złożoności badanego układu, Autorka określiła potencjalne warunki wykorzystania modyfikowanych supermagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza w obrazowaniu metodą MRI, a także poszerzyła możliwości tej metody o mikroskopię fluoroscencyjną, wykorzystując dwufunkcyjne środki kontrastujące.

Autorka pracowała na bardzo złożonym, wielofazowym materiale otrzymywanym drogą syntezy chemicznej. Właściwie dobrana metodyka badań i prawidłowo przeprowadzona interpretacja wyników pokazała, że Doktorantka dobrze porusza się w takim interdyscyplinarnym obszarze, jakim jest inżynieria biomateriałów z wykorzystaniem nowoczesnych metod nanotechnologii.

W konkluzji stwierdzam, że praca Pani mgr Gabrieli Kanii pt: "Biokompatybilne, superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza do zastosowań biomedycznych" spełnia warunki określone przez ustawę o tytule i stopniach naukowych dla prac doktorskich i wnoszę o dopuszczenie jej do publicznej obrony przed Radą Naukową Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'G' followed by a horizontal line that tapers to the right.