



Kraków, 11 lipca 2024 roku

dr hab. Małgorzata Brindell, prof. UJ
Zakład Chemii Nieorganicznej
Wydział Chemii UJ

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Marii Wróblewskiej
z tytułem
„Zastosowanie technik łączonych z detekcją spektrometrii mas z jonizacją w plazmie
sprężonej indukcyjnie do badania układów typu nanonośnik-cisplatyna”**

Praca doktorska Pani mgr inż. Anny Wróblewskiej została przygotowana w Katedrze Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego na Politechnice Warszawskiej pod kierunkiem Pani dr hab. inż. Leny Ruzik, prof. PW oraz dr hab. inż. Magdaleny Matczuk jako promotora pomocniczego.

Cisplatyna pomimo wielu skutków ubocznych wciąż jest stosowana w chemioterapii nowotworów i dla niektórych typów nowotworów uzyskuje się dużą skuteczność leczenia. Oprócz cisplatyny w użyciu jest kilka innych kompleksów platyny stosowanych głównie w przypadku oporności na cisplatynę. Ogromnym problemem stosowania tego typu leków jest ich mała selektywność, a co za tym idzie ich duża toksyczność. Jednym ze sposobów obniżenia tej toksyczności jest zastosowanie nośników, które z jednej strony pozwolą na bardziej celowane dostarczenie leku do tkanki nowotworowej, a z drugiej strony zwiększone dostarczanie leku do nowotworu umożliwi obniżenie dawki leku, a tym samym zmniejszenie jego toksyczności. Badania nad nośnikami, a szczególnie nanonośnikami dla leków są bardzo zaawansowane. Prac dotyczących zastosowania zarówno nanocząstek złota jak i liposomów jako nanonośników dla cisplatyny lub innych kompleksów platyny jest sporo, natomiast prace dotyczące metod analitycznych, które pozwoliłyby na charakterystykę takich układów w warunkach zbliżonych do *in vitro* czy *in vivo* jednocześnie analizujące nanonośnik i metalolek należą do nielicznych. I właśnie w tę lukę badawczą wpisują się badania prowadzone w Katedrze Chemii Analitycznej przez p. prof. Ruzik oraz dr hab. Matczuk, a tematyka doktoratu p. mgr inż. Wróblewskiej skupia się na opracowaniu metodologii do badania takich układów wykorzystując spektrometrię mas z jonizacją w plazmie sprężonej indukcyjnie jako metodę detekcji w połączeniu z techniką separacji taką jak chromatografia cieczowa HPLC lub elektroforeza kapilarna.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska ma charakter autoreferatu, którego integralną częścią jest 5 prac opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej JCR. Doktorantka w pracach P2-P4 jest pierwszym współautorem, natomiast w pracy P1, która jest artykułem przeglądowym jest drugim współautorem. Rozprawa rozpoczyna się od podziękowań, a następnie umieszczone są streszczenia w języku polskim oraz angielskim. Są one bardzo dobrze przygotowane i pozwalają w sposób zwięzły, ale dokładny na zapoznanie się z tematyką pracy, wykorzystywaną metodyką badawczą oraz otrzymanymi wynikami. Kolejno znajduje



się spis treści oraz lista 5 publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej. Dalej w pracy znajduje się wykaz używanych skrótów, co w znacznym stopniu ułatwia czytanie autoreferatu.

Część I autoreferatu to „Wprowadzenie w problematykę prowadzonych badań”, stanowi ono swoisty przewodnik po tematyce, którą zajmowała się Doktorantka. Chciałabym podkreślić, że jest to bardzo dobrze przygotowany fragment pracy doktorskiej napisany w taki sposób, że jest on zrozumiały zarówno dla studenta, naukowca, a i specjalista w tej dziedzinie znajdzie interesujące informacje. Autorka rozpoczyna go od wprowadzenia do problematyki leczenia chorób nowotworowych i wykorzystania w terapii kompleksów platyny wskazując potrzebę badań nad systemami dostarczania leków (DDS), które są tematem Jej pracy doktorskiej. Kolejno Doktorantka omawia rolę nanomateriałów w medycynie, ze szczególnym uwzględnieniem możliwości wykorzystania nanocząstek złota i liposomów w terapiach przeciwnowotworowych. W dalszej części już dokładnie omówione są te dwa układy w kontekście zastosowania ich jako systemów dostarczania cisplatyny. Szczególnie cenny jest rozdział 3.4, gdzie Doktorantka dyskutuje problemy i zagrożenia związane z wprowadzeniem do badań klinicznych nanoformulacji leków. To krytyczne podejście do tematu świadczy o dojrzałości naukowej p. mgr inż. Anny Wróblewskiej. Ta część autoreferatu zawiera również przegląd technik analitycznych, które były wykorzystywane do charakterystyki połączeń nanoosznik-kompleks platyny. Szczególną uwagę Doktorantka poświęciła technikom łącznym, zarówno omówieniu sposobu ich działania, zalet i wad, jak i pokazaniu ich zastosowania do układów, które były przedmiotem Jej badań, tj. nanocząstki złota lub liposomy w połączeniu z kompleksami platyny. Przedstawiony przegląd technik analitycznych z uwzględnieniem informacji o ich możliwościach i ograniczeniach pozwala czytelnikowi zrozumieć problemy jak i wyzwania, których podjęła się Doktorantka w swojej pracy. Takie podejście do metodyki badań wskazuje na dojrzałość naukową Doktorantki i jej racjonalne podejście do planowania eksperymentów. Przygotowany wstęp wyraźnie wskazuje na jej dogłębną wiedzę w tematyce badań jak i na umiejętność przekazania jej w jasny i zrozumiały sposób. Ta część oparta jest na 131 pozycjach literaturowych i stanowi świetne kompendium wiedzy, a także uzasadnia celowość podjętych badań.

Druga część autoreferatu dotyczy „Omówienia osiągnięć badawczych”. Rozpoczyna się ona od wskazania co było wcześniej już odkryte przez innych badaczy, a co pozostaje niejasne, gdzie istnieją luki zarówno w analizie procesu otrzymywania jak i charakterystyki systemów dostarczania leków dla cisplatyny (^{Pt}DDS). Rozważania te oparte są o pracę P1, której współautorką jest p. Wróblewska. Z oświadczenia Doktorantki wynika, że była ona autorką rozdziałów dotyczących wykorzystania spektrofotometrii UV-Vis i spektrofluorymetrii do charakterystyki ^{Pt}DDS, jednak przygotowane w autoreferacie opracowanie dotyczy dużo szerszego aspektu uwzględniającego całą gamę technik analitycznych, w tym technik łączonych. Jest to bardzo dobrze przygotowane opracowanie wnoszące wiele istotnych informacji i komentarzy.

Autorka kolejno przedstawiła cel pracy, który został jasno sformułowany, a dotyczył on opracowania metod analitycznych opartych na technikach łączonych z detekcją ICP-MS, które



pozwołyby na charakterystykę układów nanonośnik-cisplatyna (monitorowanie procesu otrzymywania i stabilności, charakterystyka jakościowa i ilościowa form cisplatyny i nanonośnika). Jako nanonośniki zostały wybrane nanocząstki złota i liposomy, a jako metody rozdzielania chromatografia cieczowa HPLC oraz elektroforeza kapilarna.

Kolejna część autoreferatu zatytułowana „Przewodnik po publikacjach P2-P5” zawiera dwa rozdziały, w których Autorka zawarła najistotniejsze informacje o badanych układach tj. nanocząstki złota-cisplatyna (na bazie publikacji P2 i P3) oraz liposomy-cisplatyna (na bazie prac P4 i P5). Każda z tych części opatrzona jest krótkim wstępem przedstawiającym motywację podjętych badań, ich cel oraz odniesienie badań do istniejącej wiedzy na ten temat. Pomimo tego, że jest to tylko przewodnik po publikacjach, opracowanie przygotowane przez Doktorantkę daje pełen obraz prowadzonych badań, a dyskusja otrzymanych wyników jest bardzo dojrzała. Cennym elementem tych części jest wskazanie problemów badawczych, którymi warto byłoby się w przyszłości zająć, dyskusja niepowodzeń, często pomijana, a przecież wnosząca wiele istotnych informacji dla badawczy pozwalających na uniknięcie powtarzania tych samych błędów czy na eliminację nieefektywnych metod badawczych. Każda z prac jest dostępna, opublikowana w bardzo dobrych czasopismach, a więc pod względem merytorycznym była już oceniana więc pozwolę sobie jedynie na krótkie przytoczenie tematyki każdej z nich. Należy zaznaczyć, iż Doktorantka brała udział w przygotowaniu wstępnych wersji tych publikacji, rysunków, tabel i wykresów.

Pierwsza praca jest przeglądem literaturowym.

- Praca „**Methodology for characterization of platinum-based drug's targeted delivery nanosystems**” została opublikowana w *Journal of Controlled Release* (2021, 335, 179-190; IF₂₀₂₃ = 11,5), liczy 13 stron, opublikowana została w otwartym dostępie.

Praca ta jest przeglądem literatury na temat metodologii wykorzystywanej do charakterystyki systemów dostarczania leków opartych o kompleksy platyny. Praca jest świetnie napisana, zawiera wiele komentarzy, wniosków jak i również kluczowych pytań, na które odpowiedź jest wyzwaniem dla naukowców. Zgodnie z oświadczeniem Doktorantki i innych współautorów była ona autorką dwóch podrozdziałów: 2.1. *UV/Vis spectrophotometry* oraz 2.2. *Spectrofluorimetry*. Akurat nie tymi technikami Doktorantka zajmowała się w swoim doktoracie, ale udział w pracy nad przeglądem niewątpliwie pozwolił jej na głębsze wejście w tematykę badań i poszerzenie swojej wiedzy. Praca ta była cytowana już 19 razy, co świadczy o bardzo dużym zainteresowaniu badaczy przygotowanym przeglądem.

Kolejne dwie prace dotyczą badań układów nanocząstki złota-cisplatyna

- Praca „**Drawbacks in the efficient monitoring of gold nanoparticle-based cisplatin delivery systems formation by HPLC-ICP-MS**” została opublikowana w *Metallomics* (2023, 15, mfa002; IF₂₀₂₃ = 2,9) w otwartym dostępie jako komunikat, liczy 10 stron, dodatkowo na stronie wydawnictwa dostępny jest również 9-stronicowy suplement. Doktorantka jest pierwszym współautorem tej pracy.



Nowatorskie podejście w niniejszej pracy polegało na wykorzystaniu techniki HPLC z kolumną chromatograficzną C18 o zwiększonych porach do chromatografii w odwróconej fazie jako modułu rozdzielającego połączonego z detektorem ICP-MS do badania połączeń nanocząstki złota-cisplatyna. Zgodnie z oświadczeniem Doktorantki i innych współautorów, można stwierdzić, że jej wkład w powstawanie tej pracy był znaczący. Oprócz wykonania części badań współtworzyła ona koncepcję badawczą jak i planowała badania. Jak sama Doktorantka nadmienia w swoim autoreferacie „*Przedstawione w rozdziale Comparison of chromatographic and electrophoretic-based methods spostrzeżenia i uwagi nt. obu metod analitycznych stanowią źródło cennych informacji dla innych analityków zastanawiających się nad wyborem właściwego modułu rozdzielania*”. Dodatkowy aspekt tej pracy to wykorzystanie opracowanej metody analitycznej do śledzenia procesu optymalizacji przygotowania nanonośnika i przyłączanego do niego kompleksu platyny.

- Praca „**Targeted delivery of cisplatin by gold nanoparticles: the influence of nanocarrier surface modification type on the efficiency of drug binding examined by CE-ICP-MS/MS.**” została opublikowana w *Int. J. Mol. Sci.* (2022, 23, 2324; IF₂₀₂₃ = 4,9) w otwartym dostępie, liczy 17 stron, dodatkowo na stronie wydawnictwa dostępny jest również 5-stronicowy suplement. Doktorantka jest pierwszym współautorem tej pracy.

Praca ta skupiła się na opracowaniu nowej i wszechstronnej metody analitycznej wykorzystującej jako moduł rozdziału elektroferezę kapilarną a jako detektor ICP-MS. Należy zaznaczyć, iż otrzymane dane są unikatowe, po raz pierwszy w sposób ilościowy oceniono wpływ poszczególnych grup funkcyjnych modyfikatorów nanocząstek złota na wydajność i kinetykę tworzenia połączeń z kompleksem platyny. Zgodnie z oświadczeniem Doktorantki i innych współautorów, można stwierdzić, że jej wkład w powstawanie tej pracy był znaczący. Oprócz wykonania części badań, planowała badania oraz była odpowiedzialna za opracowanie, analizę i interpretację wszystkich przeprowadzonych badań. Artykuł doczekał się już 8 cytowań, mimo iż został opublikowany stosunkowo niedawno.

- Praca „**Optimization of a CE-ICP-MS/MS method for the investigation of liposome–cisplatin nanosystems and their interactions with transferrin**” została opublikowana w *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* (2022, 37, 1442-1449, IF₂₀₂₃ = 3,1) w otwartym dostępie, liczy 8 stron, dodatkowo na stronie wydawnictwa dostępny jest również 7-stronicowy suplement. Doktorantka jest pierwszym współautorem tej pracy.

Głównym efektem tej pracy było opracowanie metodologii pozwalającej na ilościowe monitorowanie tworzenia układu liposom-cisplatyna, jego stabilności w warunkach zbliżonych do fizjologicznych jak i sprawdzenie wpływu transferyny na jego stabilność. Opracowana metoda pozwoliła na jednoczesną analizę liposomu (fosfor), leku (platyna) i białka (siarka) wykorzystując sygnały od różnych pierwiastków za pomocą jednego pomiaru. Niewątpliwie należy ją uznać za nowatorską i otwierającą możliwości opracowania metod do bardziej skomplikowanych układów w warunkach in vitro. Zgodnie z oświadczeniem Doktorantki



i innych współautorów, można stwierdzić, że jej wkład w powstawanie tej pracy był znaczący. Podobnie jak w poprzedniej pracy Doktorantka oprócz wykonania części badań, planowała badania oraz była odpowiedzialna za opracowanie, analizę i interpretację wszystkich przeprowadzonych badań. Oprócz wykonania części badań, współtworzyła ona koncepcję badawczą jak i planowała badania. Artykuł doczekał się już 6 cytowań, mimo iż został opublikowany stosunkowo niedawno.

- Praca „**Toward the boosted loading of cisplatin drug into liposome nanocarriers**” opublikowana w *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2024, **198**, 114245, IF = 5,02) liczy 8 stron, dodatkowo na stronie wydawnictwa dostępny jest również 5-stronicowy suplement. Doktorantka jest pierwszym współautorem tej pracy.

W pracy tej badania skupiły się na wykorzystaniu metodologii badawczej opartej o wykorzystanie CE-ICP-MS/MS, zoptymalizowanej do układów liposom-cisplatyna w pracy P4, do sprawdzenia wpływu różnych parametrów na efektywność otrzymywania liposomów i enkapsulację leków. Zostały zbadany wpływ medium rozcieńczającego, składu liposomów oraz dializy czy procedury zamrażania/rozmarzania. Dużym sukcesem było otrzymana formułacji liposom-cisplatyna charakteryzującej się wysokim stopniem enkapsulacji leku, ponad 100 mg na litr. Zgodnie z oświadczeniem Doktorantki i innych współautorów, można stwierdzić, że jej wkład w powstawanie tej pracy był znaczący, choć tutaj jej rola była nieco odmienna. Opracowywała one wszystkie dane i przygotowywała z nich raporty, a także koordynowała pracę Dyplomantki.

Podsumowując, w przedstawionych pracach zgromadzone dane, ich analiza i interpretacja są na najwyższym poziomie i jestem pewna, że wielu badaczy z nich skorzysta w przyszłości. W pracach tych został zaprezentowany bardzo bogaty zestaw zaawansowanych metod badawczych, a każda z nich wymagała dobrego przygotowania zarówno podczas przygotowania próbek, wykonywania eksperymentów jak i analizy otrzymanych danych. We wszystkich tych aspektach Doktorantka wykazała się dużym profesjonalizmem i dojrzałością naukową. Uważam to za ogromny sukces Doktorantki.

Ostatnia część autoreferatu Doktorantki to podsumowanie, które w sposób zwięzły, ale jednocześnie dokładny przedstawia najważniejsze wnioski wyciągnięte z przeprowadzonych badań.

Dalej zostały umieszczone wszystkie prace ujęte w rozprawie doktorskiej, oświadczenia współautorów, bibliografia obejmująca 148 pozycji, spis rysunków i tabel oraz życiorys naukowy Doktorantki.

Wyniki będące podstawą rozprawy doktorskiej zostały już opublikowane w bardzo dobrych czasopismach, a więc poddane wnikliwej ocenie przez specjalistów, niewątpliwie stanowią one



ceną bazę informacji na temat postępowania analitycznego do charakterystyki układów nanonośnik-metalolek. Nie mam krytycznych uwag również w stosunku do autoreferatu jest on świetnie przygotowany. Z obowiązków recenzenta wymienię kilka punktów do przedyskutowania podczas obrony pracy doktorskiej.

1. W pracy P3 wyznaczono dla nanocząstek złota PDI oraz potencjał zeta, proszę, aby Doktorantka skomentowała otrzymane wartości w kontekście jakości uzyskanych nanonośników oraz układu nanonośnik-cisplatyna?
2. W pracy P4 Doktorantka badała wpływ transferyny na stabilność systemów liposom-cisplatyna, czy podobne badania były wykonywane dla albuminy, której jest ok. 20-krotnie więcej w krwioobieg?
3. W pracy P4 wspomniano o zmierzonym potencjale zeta, ale nie umieszczono danych w publikacji, proszę o przedstawienie danych.
4. Czy Doktorantka mogłaby przedstawić jakie inne techniki oprócz DLS mogłyby być użyte, aby potwierdzić wielkość i dystrybucję rozmiarów otrzymywanych nanocząstek?
5. Czy Doktorantka mogłaby przedstawić swoją opinie na temat możliwości wykorzystania badanych układów w badaniach przedklinicznych, który z zaproponowanych systemów jest gotowy do takich badań, czy należy wykonać jakieś dodatkowe badania przed rozpoczęciem badań *in vivo*?

Podsumowując moją ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Wróblewskiej chciałabym podkreślić wysoki poziom merytoryczny przeprowadzonych badań. Część badań, które przeprowadziła Doktorantka niewątpliwie można uznać za pionierskie. Na duże uznanie zasługuje fakt, iż wszystkie prace zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach naukowych.

Ja niżej podpisana stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Wróblewskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdzając wiedzę oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez Doktorantkę, zatem spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r., poz. 742, z późn. zm.). Wnoszę więc do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Wróblewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną uzyskanych wyników, omówioną przeze mnie we wcześniejszej części recenzji jak również zebrane w osobnym wniosku oraz ich opublikowanie w uznanych czasopismach, stawiam wniosek do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy.

Karolina Pruska