

Toruń, 28 czerwca 2024r.

dr hab. Małgorzata Szultka-Młyńska, prof. UMK
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Chemii
ul. Gagarina 7
87-100 Toruń

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Marii Wróblewskiej

pt. „Zastosowanie technik łączonych z detekcją spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie do badania układów typu nanonośnik–cisplatyna”
wykonanej na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej pod kierunkiem Promotora

Pani dr hab. inż. Leny Ruzik, prof. PW oraz Promotora Pomocniczego

Pani dr hab. inż. Magdaleny Matczuk

Klasyczne formy terapii takie jak chirurgia, chemioterapia i radioterapia, są w obecnej chwili tylko częściowo skuteczne w walce z nowotworami. Pomimo licznych osiągnięć w dziedzinie genetyki i biologii molekularnej, wirusologii, chemii oraz farmakologii, nowotwory nadal skutecznie unikają leczenia. Jednakże dzięki rosnącej innowacyjności, odkryciom naukowym i postępowi technologicznemu, rozumienie choroby nowotworowej ulega głębokiej przemianie. Chociaż jeszcze w początkowym stadium, tak zwana medycyna spersonalizowana staje się nowym paradygmatem w leczeniu nowotworów. Starzenie się społeczeństwa oraz rozwój medycyny i skutecznych terapii dla wielu schorzeń powodują zmiany w strukturze przyczyn umieralności. W ostatniej dekadzie obserwujemy wzrastającą rolę nowotworów złośliwych jako przyczyny zgonów, przy malejącej roli chorób układu krążenia. Nowotwory złośliwe stanowią w Polsce drugą pod względem częstości przyczynę zgonów po chorobach krążenia. Udział poszczególnych umiejscowień i typów nowotworów w zgonach zmienia się z czasem i jest zależny od płci.

Cisplatyna to lek stosowany w chemioterapii nowotworów, który został dopuszczony do stosowania w latach 70-tych XX wieku, jako pierwszy lek z grupy leków przeciwnowotworowych zawierających platynę. Stosowana początkowo w leczeniu raka jąder

i raka jajnika, szybko stała się podstawą wielu schematów leczenia skojarzonego nowotworów różnego typu. Charakteryzuje się dużą skutecznością, ale i dużym ryzykiem wystąpienia poważnych działań niepożądanych; w niektórych przypadkach może być zastąpiona przez związki platyny o mniejszej toksyczności. Związki platyny są powszechnie stosowane w chemioterapii guzów litych. W Polsce cisplatyna stosowana jest w monoterapii lub w leczeniu skojarzonym z innymi lekami przeciwnowotworowymi w chemioterapii: raka jąder, raka jajnika, nowotworów szyjki macicy, zaawansowanego raka pęcherza moczowego, raka płaskonabłonkowego głowy i szyi czy raka płuca. Działanie cisplatyny polega na oddziaływaniu z materiałem genetycznym komórki, tj. z kwasem nukleinowym DNA. Zahamowanie przebiegu podstawowych procesów biologicznych staje się sygnałem prowadzącym do śmierci komórki. Możliwe są także dodatkowe mechanizmy działania cisplatyny, w tym poprzez nasilenie immunogenności nowotworu oraz poprzez zwiększenie jego wrażliwości na radioterapię.

Stąd też, niewątpliwie ważnym aspektem jest opracowanie innowacyjnych rozwiązań, po to aby zapobiegać wyżej opisanym schorzeniom. Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Marii Wróblewskiej dotyczy otrzymywania stabilnych układów nanonośnik-cisplatyna, wykorzystujących bezpieczne nanomateriały i charakteryzujące się dużym współczynnikiem wiązania leku. Istotnym jest określenie wydajności oraz kinetyki dla systemów dostarczania leków przeciwnowotworowych (DDS). Stąd, zaadoptowanie przez Doktorantkę unikatowych rozwiązań oraz opracowanie wyselekcjonowanych procedur analitycznych celem oznaczenia i identyfikacji związków biologicznie aktywnych wskazujących na ryzyko powstania bądź rozwoju nowotworu. Nadrzędnym celem badań Doktorantki było opracowanie systemu dostarczania leków przeciwnowotworowych (cisplatyna) z zastosowaniem nanocząstek złota (AuNPs) oraz liposomów. Rozprawa ma charakter zbioru 5 powiązanych tematycznie artykułów naukowych (publikacji z listy JCR). Wszystkie prace są wieloautorskie (od 4 do 7 współautorów), w 4 pracach Pani Anna Wróblewska jest pierwszym autorem. Prace zostały opublikowane w czasopiśmie indeksowanych przez bazę Scopus (sumaryczny współczynnik wpływu $IF=28,767$, *Journal of Controlled Release* ($IF=11,467$), *Metallomics* ($IF=3,4$), *International Journal of Molecular Sciences* ($IF=5,6$), *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* ($IF=3,4$) i *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* ($IF=4,9$). Rozprawa liczy 202 strony (w tym 148 pozycji literatury), załączonych publikacji, wykazu

dorobku naukowego oraz opisu wkładu Doktorantki w realizację poszczególnych prac naukowych.

W toku prowadzonych badań mgr inż. Anna Wróblewska realizowała wytyczone przez siebie cele jak:

- opracowanie metod tworzenia systemów dostarczania leku przeciwnowotworowego opartego na platynie (cisplatynie) z zastosowaniem nanomateriałów metalicznych (nanocząstki złota) oraz organicznych (liposomów),
- opracowaniu i doborze parametrów wybranych metod analitycznych wykorzystujących spektrometrię mas, techniki chromatograficzne oraz elektroforetyczne, jak również spektrometrię mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną, umożliwiających ilościową i jakościową analizę uzyskanych połączeń nanonośnik-cisplatyna,
- opracowanie warunków analizy charakterystycznych dla płynów fizjologicznych oraz zastosowanie łagodnych odczynników buforujących,
- określenie wydajności dla uzyskanego wiązania (kapsułkowania) metaloleku w zależności od panujących warunków ich powstawania,
- podjęcie próby zastosowania zaproponowanych metod analitycznych w badaniach nad stabilnością wybranych połączeń w czasie oraz obecności białka surowiczego.

W rozprawie doktorskiej zamieszczono cykl pięciu spójnych tematycznie artykułów naukowych. W publikacji [1] (praca przeglądowa) Autorka podkreśla, iż konwencjonalne terapie przeciwnowotworowe wykorzystujące leki na bazie platyny polegają głównie na wewnątrznaczyniowym wstrzyknięciu środka terapeutycznego. Lek przeciwnowotworowy jest rozprowadzany po całym organizmie poprzez ogólnoustrojowe krążenie krwi i ulega wychwytwi komórkowemu, szybkiemu klirensowi i wydalaniu. W rezultacie tylko niewielka część leku na bazie platyny dociera do miejsca guza, co wiąże się z poważnymi skutkami ubocznymi. Z tego powodu systemy ukierunkowanego dostarczania leków są bardzo potrzebne, ponieważ zapewniają ulepszone i selektywne dostarczanie do komórek nowotworowych, dzięki czemu terapia jest bezpieczna i skuteczniejsza. Do chwili obecnej opracowano i przetestowano różnorodne oparte na platynie systemy ukierunkowanego dostarczania leków wykorzystujące nanomateriały przy użyciu szeregu technik analitycznych, które dostarczyły niezbędnych informacji na temat ich syntezy, stabilności, biodystrybucji i cytotoksyczności. Doktorantka

dokonyuje szczegółowego przeglądu literaturowego stosowanych technik eksperymentalnych, wskazując ich przydatność na różnych etapach badań, a także wymieniając ich mocne strony, jak i ograniczenia. Ponadto, istniejące strategie i podejścia są poddawane krytycznemu przeglądowi w celu ujawnienia i zapoczątkowania rozwoju metodologii analitycznej odpowiedniej do wiarygodnej charakterystyki opracowywanych systemów monitorujących, co ostatecznie doprowadziłoby do powstania nowych terapii i lepszych wyników wśród pacjentów. W publikacji [2] Autorka po raz pierwszy przedstawia wyniki badań dotyczących nowatorskiego zastosowania połączenia technik HPLC i ICP-MS do wstępnej oceny *on-line* różnych formacji systemów monitorujących, składających się z nanonośników złota i cisplatyny. Badania obejmują optymalizację metod analitycznych w oparciu o chromatografię cieczową. Niestety zoptymalizowana metoda HPLC–ICP-MS nie zapewniła zadowalających parametrów rozdzielania. Uniemożliwiło to dokładne określenie wydajności tworzenia rozważanych nanokoniugatów. Doktorantka podkreśla, że chemioterapia ma wiele ograniczeń związanych ze skutkami ubocznymi leków przeciwnowotworowych (np. cisplatyny), badane są nanocząstki jako nośniki w ukierunkowanym dostarczaniu leków. Nanocząstki złota (AuNPs) są szeroko badane ze względu na ich biokompatybilność czy nietoksyczność. Pomimo wielu doniesień na temat układów AuNPs–cisplatyna (AuNP–CS) spotykanych w literaturze, tylko nieliczne obejmują badania nad ich syntezą i wydajnością tworzenia z wykorzystaniem narzędzi analitycznych dostarczających jednocześnie jakościowych i ilościowych informacji analitycznych. Dlatego badania te stanowią innowacyjne podejście do badań nad tworzeniem się układów AuNP – CS badanym za pomocą elektroforezy kapilarnej i spektrometrii mas w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-MS). W publikacji [3] Autorka podkreśla, iż uzyskane wyniki potwierdziły, że rodzaj funkcjonalizacji użytego nanonośnika determinuje jego zdolność do skutecznego wiązania cisplatyny. W zależności od grupy funkcyjnej, czasu prowadzenia reakcji czy pH środowiska mieszaniny reakcyjnej, stężenie i postać leku mogą mieć decydujący wpływ na tworzenie i długoterminową stabilność (w tym uwalnianie leku i stabilność koloidalną) układów nanocząstki złota – cisplatyna. Stabilizacja ładunku ugrupowania i dostępność miejsc wiązania stanowią znaczące czynniki. Utworzone nanokoniugaty charakteryzują się najwyższą stabilnością podczas inkubacji (24 godziny), co skutkuje minimalnym uwalnianiem leku. Co więcej, badania wykazały różnice w kinetyce poszczególnych reakcji tworzenia układów. Przedstawione w artykule wyniki stanowią

znaczący fundament do dalszych badań w tej dziedzinie. Zebrane dane mogą przyczynić się do opracowania udoskonalonych systemów dostarczania leków do celów medycznych. W przeprowadzonych eksperymentach wykorzystano kilka technik, najbardziej wszechstronna okazała się jednak technika CE-ICP-MS/MS, która wskazywana jest jako „metoda z wyboru” w tego typu badaniach, bowiem dostarcza przejrzystych informacji jakościowych i ilościowych o powstaniu i stabilności układów, dzięki możliwości jednoczesnego rozdzielania każdego składnika próbki i izotopowo specyficznej identyfikacji przy zachowaniu niskiej granicy wykrywalności (LOD). W publikacji [4] Doktorantka prezentuje rozwiązanie połączenia tandemowej spektrometrii mas CE i ICP (ICP-MS/MS) wyposażonej w komorę reakcji zderzeń z tlenem jako gazem reakcyjnym. Takie podejście wpływa na większą czułość i znacznie ogranicza zakłócenia powodowane przez atomy siarki czy fosforu, co można określić ilościowo jako charakterystyczne sygnały. Należy zaznaczyć, iż do tej pory połączenie CE-ICP-MS/MS zastosowano tylko raz w badaniu układów opartych na liposomach przeprowadzonym przez Naukowców (Ansar i Mudalige), którzy określili ilościowo wewnętrzny i zewnętrzny siarczan liposomów w różnych (zatwierdzonych przez FDA) preparatach liposomów i dokсорubicyny w celu kontrolowania efektywności kapsułkowania dokсорubicyny. Zastosowana metoda nie dostarczyła jednak wystarczających informacji. Dla porównania, badania Doktorantki miały na celu optymalizację metody CE-ICP-MS/MS w celu jednoczesnego oznaczania ilościowego białek, liposomów i postaci leków na bazie Pt. Przedstawiona ulepszona metoda oferuje zaletę bezpośredniego oznaczania ilościowego liposomów modyfikowanych białkami (jak również przyszłych ligandów) i interakcji układ-białko surowicy ludzkiej (poprzez monitorowanie sygnału), na które nie mają wpływu zakłócenia widmowe związane z siarką. Natomiast drugim aspektem, dotychczas niewdrożonym, jest przeprowadzanie analiz w symulowanych warunkach fizjologicznych podczas separacji gatunków. W publikacji [5] Autorka zaznacza, iż aktualne wyzwania w onkologii w dużej mierze wiążą się z koniecznością poprawy efektywności leczenia nowotworów i ograniczeniem skutków ubocznych leków. Skuteczna strategia radzenia sobie z tymi wyzwaniami kryje się za projektowaniem i rozwojem systemów dostarczania leków opartych na inteligentnych nanomateriałach i zatwierdzonych lekach przeciwnowotworowych. Niniejsze badanie oferuje nowatorskie i proste podejście do skutecznego umieszczania leku (cisplatyny) do nowo skonstruowanych nanoukładów opartych na liposomach, a także niezawodną technikę monitorowania tego procesu w oparciu o

elektroforezę kapilarną połączoną z tandemową spektrometrią mas ze sprzężoną indukcyjnie plazmą. Proponowana metodologia obejmuje tworzenie liposomów za pomocą prostej metody wstrzykiwania etanolu i kapsułkowanie leku za pomocą dostosowanych procedur zamrażania-rozmrażania lub liofilizacji-hydratacji. Aby zoptymalizować wytwarzanie liposomów i kapsułkowanie leku, szczegółowo zbadano wpływ ośrodka rozcieńczającego i składu liposomów (rodzaje fosfolipidów i ich stosunek procentowy). Wykazano, że niewielkie zmiany składu trójskładnikowych liposomów fosfolipidowych oraz parametrów procedury zamrażania i rozmrażania mają znaczny wpływ na tworzenie się układów cisplaty-na-liposom. Otrzymany preparat cisplaty-na-liposom stwarza nadzieję na dalszy rozwój badań przedkliniczny jako silną platformę dostarczania leku.

Z formalnego punktu widzenia oceniana rozprawa obejmuje 202 stron maszynopisu podzielonych na szereg rozdziałów, wśród których można wymienić części typowe dla tego typu dzieł, czyli: wprowadzenie, przegląd literatury, omówienie problemu badawczego, po czym umiejscowiono podsumowanie i wnioski, bibliografia (148 pozycji literaturowych, z czego ok. 85 % to prace starannie dobrane, opublikowane w ostatnim pięcioleciu). Tekst został napisany jasnym i poprawnym językiem. Autorka rozprawy doktorskiej znacząco utrudniła recenzentowi doszukania się niejasności i uchybień dbając o poprawność, także pod kątem gramatycznym i interpunkcyjnym.

Obowiązkiem recenzenta jest krytyczny komentarz ocenianej pracy. Jednakże, opisy problemu badawczego, jak i sposobu jego realizacji oraz uzyskane wyniki są zaprezentowane w sposób systematyczny i kompleksowy, co więcej poruszają wszystkie ważne aspekty, co świadczy o szerokiej wiedzy Doktorantki i wyjątkowej znajomości tematu. Podjęcie przez Doktorantki niniejszego tematu badawczego uważam za uzasadnione i niezwykle ważne z punktu widzenia metodologicznego i aplikacyjnego. Praca jest nowatorska, a otrzymane wyniki przedstawione zostały po raz pierwszy. Stwierdzam, że postawione cele pracy badawczej zostały w pełni zrealizowane, a osiągnięte wyniki stanowią istotny wkład w rozwój dziedziny.

Chciałabym podkreślić całokształt pracy Doktorantki. Efektem pracy Pani Anny Wróblewskiej jest aż 8 publikacji naukowych, w tym 5 publikacji związanych z tematyką doktoratu (IF=28,767). Stanowią one zwartą całość przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej. Tak obszerne badania nie są opisane wcześniej w literaturze. Dodam w tym miejscu, iż tematyka badawcza jest według mojej opinii w pełni aktualna. Ponadto, na dorobek

naukowy Doktorantki składa się liczne wystąpienia konferencyjne w formie referatów oraz posterów.

Podsumowując, Doktorantka podczas realizacji projektu doktorskiego uzyskała bardzo bogaty materiał doświadczalny. Dotyczy on bardzo istotnego zagadnienia jakim jest opracowanie metod analitycznych związanych z rozwijaniem nowatorskich metod w zakresie profilaktyki i monitorowania chorób nowotworowych. Dorobek Doktorantki uważam za bardzo istotny. Pięć prac związanych z tematyką doktoratu opublikowane w uznanych przez środowisko naukowe czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania, uważam za dowód dojrzałości oraz samodzielności naukowej Kandydatki. Podjęta tematyka jest aktualna i posiada niezwykle istotny potencjał aplikacyjny. Projekt rozprawy jest przemyślany, cele jasno określone i osiągnięte przy dużym nakładzie pracy. Wnioski są poparte danymi eksperymentalnymi i odniesieniami do stanu wiedzy w literaturze. Uzyskane i opisane w ramach niniejszej pracy wyniki bezsprzecznie poszerzyły oraz usystematyzowały wiedzę w podjętym zakresie naukowym.

Wniosek końcowy

W związku z powyższym z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wszelkie warunki określone w stosownej Ustawie i **wniosuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie mgr inż. Anny Marii Wróblewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego**. Jednocześnie ze względu na zaangażowanie w pracę badawczą Doktorantki, wartościowy naukowo i wysoki poziom merytoryczny badań, a także bogaty dorobek naukowy pragnę rekomendować niniejszą rozprawę doktorską **do wyróżnienia**.

dr hab. Małgorzata Szultka-Młyńska, prof. UMK