

prof. dr hab. Tomasz Puzyn  
Kierownik Pracowni Chemoinformatyki Środowiska

Gdańsk, 22 lipca 2022 r.

## R E C E N Z J A

**rozprawy doktorskiej mgr. Pawła Nalepy  
pt. „Wybrane nanotechnologie dla syntezy nowych terapeutyków o znaczeniu  
przeciwnowotworowym”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr. Pawła Nalepy poświęcona jest projektowaniu i syntezie nanocząstek o potencjalnym zastosowaniu w terapiach przeciwnowotworowych. Praca doktorska wykonana została na Wydziale Nauk Ścisłych i Technicznych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach pod kierunkiem prof. dr. hab. inż. Jarosława Polańskiego (promotor) oraz dr. inż. Macieja Serdy (promotor pomocniczy). Warto w tym miejscu podkreślić, że liczne osiągnięcia naukowe zespołu profesora Polańskiego w zakresie projektowania nowych związków chemicznych są wysoko cenione w kraju i za granicą. Część wyników badań przedstawionych w pracy uzyskano w ramach projektu badawczego „Nowe glikofullereny dla terapii przeciwnowotworowych” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu SONATA (UMO-2016/23/D/NZ7/00912), w którym Doktorant pełnił rolę wykonawcy.

Rozprawa ma formę klasyczną; liczy 198 stron, zawiera 147 rysunków, 12 tabel oraz odwołuje się do 123 pozycji literaturowych. Podaję te wartości, żeby zobrazować ogrom pracy, którą mgr Nalepa włożył w przygotowanie rozprawy.

Po stronie tytułowej, zwyczajowych podziękowaniach, spisie treści oraz (bardzo przydatnym podczas lektury) wykazie skrótów następuje prezentacja założeń i celu pracy stanowiąca rozdział pierwszy. Głównym celem pracy było – jak pisze Autor – „opracowanie syntezy stabilnych nanocząstek sprzężonych z lekami przeciwnowotworowymi w celu poprawy farmakologicznych parametrów ich działania”. Jako modelowy chemioterapeutyk wybrana została gemcytabina (GEM). Badania dotyczyły nanocząstek złota oraz modyfikowanych fulerenów. Tak sformułowany cel pracy wpisuje się w czołówkę światowych badań, w ramach których podejmowane są próby wykorzystania nanocząstek jako nośników leków przeciwnowotworowych. Dzięki temu rozwiązaniu, w wyniku precyzyjnego dostarczenia leku do guza, znacznie ogranicza się problem występowania u pacjentów ubocznych skutków chemioterapii. Natomiast samo zadanie odpowiedniego zaprojektowania nanonośników nie jest trywialne, ponieważ nanocząstki wykorzystywane w tym celu powinny charakteryzować się szeregiem właściwości, m. in. dobrą rozpuszczalnością w środowisku wodnym oraz brakiem działania toksycznego dla zakładanych dawek. W tym sensie wyzwanie podjęte przez autora rozprawy ma duże znaczenie i wartość naukową.

Rozdział drugi – zatytułowany „Część literaturowa” – stanowi obszerną prezentację aktualnego stanu wiedzy w zakresie tematu pracy. W tej części Autor omawia wykorzystanie nanotechnologii w terapiach przeciwnowotworowych oraz opisuje biologiczne działanie leków wykorzystujących nanocząstki. Następnie przedstawia przykłady grup nanocząstek używanych w tym celu. Wśród nich znalazły się: nanocząstki metali szlachetnych (złota i srebra), nanocząstki magnetyczne (m. in. nanocząstki tlenku żelaza), nanorurki węglowe i tlenek grafenu, pochodne fulerenów oraz kropki

kwantowe. Lektura tej części upewnia czytelnika, że Autor zdobył ponadprzeciętną wiedzę na temat nanomedycyny. Informacje są aktualne, przedstawiane w sposób logiczny i uporządkowany, a co najważniejsze – bardzo ciekawy. Sugeruję rozważenie opublikowania tej części jako skrypt dla studentów. Z obowiązku recenzenta jednak chciałbym podzielić się drobnymi uwagami dotyczącymi tego rozdziału oraz poprosić o przedyskutowanie następujących kwestii podczas publicznej obrony:

- Tytuł sekcji 2.1. powinien brzmieć „Terapie przeciwnowotworowe”.
- Przedstawiając definicję nanocząstki (str. 15, pierwszy akapit) sugeruję Doktorantowi odniesienie się do pracy [Miernicki et al. (2019) *Nat. Nanotechnol.* 14, 208-216], w której autor precyzyjnie przedstawia różnice występujące w poszczególnych aktach prawnych regulujących kwestie wykorzystania nanomateriałów w medycynie, kosmetologii, produkcji biocydów, żywności itd.
- W sekcji 2.2. Autor przywołuje zjawisko określane w literaturze akronimem EPR. Skrót ten został niepoprawnie wyjaśniony przez niego (na stronie 15). Powinno być: „*Enhanced Permeability and Retention*”.
- Czy znane są Doktorantowi również i inne – podobne – reguły wykorzystywane przy projektowaniu nanoosników leków przeciwnowotworowych, np. „kaskada CAPIR” czy reguła „2R2SP” [Pelaz et al. (2017) *ACS Nano* 11, 2313-2381]?
- Na str. 27 Autor wspomina o stabilizacji koloidów nanocząstek przy wykorzystaniu glikolu polietylenowego (PEG). Jakie inne metody stabilizacji mogą być wykorzystywane?
- W sekcji 2.3.1. Doktorant opisuje wykorzystanie nanocząstek złota i srebra w nanomedycynie. Na stronie 22, w kontekście przedstawionych wcześniej informacji o nanocząstkach złota Autor pisze: „Podobnie z dużym zainteresowaniem świat nauki śledzi doniesienia dotyczące wykorzystania nanocząstek srebra.” Dalej (na str. 24) pisze o silnym

działaniu antybakteryjnym i antywirusowym nanocząstek srebra, w związku z działaniem opierającym się na rozrywaniu błon komórkowych, denaturacji białka, wytwarzaniu reaktywnych form tlenu, zakłócaniu procesów replikacji DNA oraz ekspresji białek łańcucha oddechowego. W tym kontekście powstaje pytanie, na ile specyficzny jest to mechanizm w odniesieniu do komórek bakterii? Czy właśnie nie ze względu na dużą cytotoksyczność obserwowaną na wielu liniach komórkowych srebro przestało być postrzegane jako tak obiecujący nanomateriał jak np. złoto? Proszę Doktoranta o przygotowanie się do dyskusji na ten temat.

- Na str. 28. Doktorant pisze: „Nanocząstki złota i srebra cechują się bowiem takimi właściwościami fizycznymi i chemicznymi, które nie mogą być zastąpione przez żaden inny materiał”. Proszę o wyjaśnienie, o jakie właściwości chodzi? Przy okazji ciekaw jestem, czy Autor wie, jakie właściwości fizykochemiczne są decydujące o wykorzystaniu danego materiału jako kontrast w obrazowaniu metodami tomografii komputerowej, a jakie magnetycznego rezonansu jądrowego?
- Na str. 60. Doktorant słusznie zauważa, że „nie prowadzi się w tej chwili badań klinicznych dotyczących nanocząstek opartych o szkielet fulerenowy czy nanorurki”. Jaka – zdaniem Autora rozprawy – jest najbardziej prawdopodobna przyczyna takiego stanu rzeczy biorąc pod uwagę fakt, że zarówno fulereny, jak i nanorurki węglowe są typowymi nanomateriałami używanymi np. w elektronice? Czy w odniesieniu do nanorurek mogłaby to być ich toksyczność związana z dużymi wartościami współczynnika kształtu (ang. *aspect ratio*) [Jagiello et al. (2021) *Small* 17, 2003465]?
- Istotnym zjawiskiem – nie wspomnianym w pracy – mogącym mieć duży wpływ na działanie nanocząstek jako nośników leków – jest tworzenie tzw. koron białkowych [Ke et al. (2017) *ACS Nano* 11, 11773–11776]. Proszę o przedyskutowanie podczas obrony, jaki

wpływ na efektywność dostarczania chemioterapeutyków przez nanocząstki zaprojektowane i otrzymane przez autora rozprawy mogłoby mieć to zjawisko? Jakie jeszcze inne formy biotransformacji mogłoby mieć tu znaczenie [*Milosevic et al. (2020) Small 16, 1907650*]?

W rozdziale trzecim Autor rozprawy charakteryzuje zakres badań własnych. Po pierwsze, wykorzystując mechanizm reakcji Bingla-Hirscha Doktorant uzyskał szereg nowych pochodnych fulerenu  $C_{60}$ , z których do dalszych badań wybrał dwa związki oznaczone symbolami: PN107 i PN109. Pierwszy z tych związków zawierał w swojej strukturze dwie przyłączone cząsteczki GEM, struktura drugiego natomiast umożliwiała łatwe ich przyłączenie. Związki te zostały dokładnie scharakteryzowane fizykochemicznie oraz przebadane na poziomie *in vitro* pod kątem – jak pisze Autor – potencjalnego działania przeciwnowotworowego. Dodatkowo w pracy umieszczone zostały wyniki dotyczące wpływu związku PN109 na przebieg fotosyntezy u wybranych roślin. Jak wyjaśnia Doktorant, rezultaty te nie są zgodne z tytułem pracy. Powstaje zatem pytanie, czy nie byłaby możliwa modyfikacja tytułu w ten sposób, żeby lepiej odpowiadał treściom zawartym w pracy? Na przykład: „Synteza biologicznie aktywnych pochodnych nanocząstek fulerenu  $C_{60}$  i złota”.

Po drugie, mgr Paweł Nalepa w serii pięciu eksperymentów zoptymalizował przebieg reakcji syntezy nanocząstek złota oraz scharakteryzował otrzymane produkty wykorzystując między innymi obrazowanie za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM), transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) w połączeniu ze spektroskopią dyspersji promieniowania rentgenowskiego (EDX), a także analizę techniką dynamicznego rozpraszania światła (DLS). W komentarzu Autora do zakresu pracy (przypis 23) Doktorant pisze: „Prócz tego, we współpracy z innymi ośrodkami, przeprowadzono badania biologiczne, sprawdzając cytotoksyczność tych nanocząstek i ich koniugatów. Wyniki powyższych badań nie zostały do tej pory opublikowane w

literaturze naukowej i głównie z tego powodu nie zostały zamieszczone w niniejszej pracy”. Zdaniem recenzenta fakt, że wyniki nie zostały opublikowane w literaturze nie stanowi przeszkody formalnej do umieszczenia w rozprawie. Poproszę o słowo komentarza.

W kolejnym (czwartym) rozdziale Doktorant dokładnie opisuje metodykę przeprowadzonych eksperymentów. Ta część napisana jest bardzo dobrze. Warto to podkreślić, gdyż w przypadku wielu prac publikowanych w czasopiśmie naukowych często brakuje szczegółów pozwalających innym zespołom odtworzyć warunki eksperymentu. Zastanawia mnie jedynie lakoniczny opis „herbaty z Maroka” oraz herbaty „marki Lipton” wykorzystywanych jako odczynniki w eksperymencie oznaczonym jako „Au-4”. O ile możemy sobie wyobrazić, że duża firma, jaką jest Unilever (właściciel marki „Lipton”), prowadzi kontrolę jakości herbaty na linii produkcyjnej zapewniając w ten sposób powtarzalność składu produktu (przynajmniej w jakimś zakresie i czasie), to opis „herbata z Maroka” wydaje się być zdecydowanie niewystarczający.

W rozdziale piątym Doktorant prezentuje uzyskane przez siebie wyniki. Do najważniejszych osiągnięć mgr. Nalepy zaliczyłbym:

- Uzyskanie stabilnego, monodispersyjnego układu nanocząstek PN107, którego elementem są agregaty o średnicy 120 nm.
- Zweryfikowanie fotoreaktywności i fototoksyczności nanocząstek PN107.
- Wykazanie zwiększonej cytotoksyczności PN107 wobec dwóch z czterech badanych linii komórek nowotworowych: ludzkiego raka piersi (MCF-7) oraz mysiego gruczolaka trzustki (PAN02). Wartości uzyskanych dawek IC50 były przy tym wielokrotnie wyższe niż dla niesprężonej gemcytabiny, co uzasadnia wykorzystanie nanocząstek jako nośników dla tego cytostatyku. Dodatkowo, wrażliwość komórek

normalnych na związek PM107 była bardzo niska, co daje nadzieję na specyficzne działanie badanego koniugatu i – w konsekwencji – mniejsze efekty uboczne ewentualnej terapii.

- Synteza i charakteryzacja związku PM109.
- Zweryfikowanie wpływu związku PM109 na fotosyntezę jako wstęp do badań nad wykorzystaniem pochodnych fulerenu w agrochemii.
- Próba optymalizacji warunków syntezy nanocząstek złota z wykorzystaniem glicerolu oraz materiału biologicznego jako reduktorów. Choć w obu przypadkach nie udało się uzyskać zadowalających rozmiarów, jednorodnych nanocząstek, które można byłoby zastosować w medycynie, to jednak tego rodzaju rezultat prowadzi również do ważnych wniosków, a jego przeprowadzenie sprawia, że kolejne zespoły wybierając będą zapewne w przyszłości inne drogi syntezy. Ciekawym wątkiem w tej części było również potwierdzenie, że synteza nanocząstek złota może być prowadzona również z wykorzystaniem ekstraktów roślinnych w roli reduktora.

Część rozprawy, której Autor prezentuje uzyskane wyniki oceniam bardzo wysoko. Uzyskanie wyników wymagało od doktoranta dużego nakładu pracy, sprawności laboratoryjnej, a także wykazania się znajomością najnowocześniejszych technik charakteryzacji wykorzystywanych we współczesnej nanotechnologii. Zastosowane metody statystycznej analizy danych nie budzą moich zastrzeżeń. Podoba mi się również sposób, w jaki Autor stawia pytania badawcze oraz dobiera metodykę w celu poszukiwania na nie odpowiedzi.

Szósty rozdział rozprawy zatytułowany jest „Wnioski”, choć moim zdaniem powinien nosić tytuł „Dyskusja wniosków”, ponieważ w rzeczywistości zawiera bardzo ciekawą, wnikliwą i

krytyczną dyskusję wyników prezentowanych w poprzednim rozdziale. Autor odnosi się do literatury, pokazując uzyskane wyniki również w szerszym kontekście.

W tej części zainteresowała mnie próba wyjaśnienia przez autora różnic w cytotoksyczności PN107 oraz GEM w stosunku do komórek nowotworowych oraz komórek zdrowych. Niską toksyczność w stosunku do komórek zdrowych charakteryzującą PN107 w porównaniu z GEM wyjaśnia nieefektywnym transportem koniugatu do jądra komórkowego. Dlaczego więc PN107 – pomimo tego – jest toksyczna w odniesieniu do komórek nowotworowych? Czy tutaj ten transport nie następuje?

W tym kontekście można byłoby również zastanowić się, jaką rolę w terapii przeciwnowotworowej związek PN107 mógłby odegrać efekt EPR, a w szczególności transport pomiędzy kolejnymi warstwami komórek guza? Czy Autor mógłby pokusić się o zaproponowanie kolejnych eksperymentów na poziomie *in vitro* przy wykorzystaniu dostępnej metodologii tego typu badań?

W siódmym rozdziale Doktorant przedstawia podsumowanie, w którym syntetycznie jeszcze raz prezentuje najważniejsze wnioski z przeprowadzonych badań. Z tej części dowiedziałem się, że wyniki uzyskane w pracy były podstawą do przygotowania krajowego patentu oraz trzech publikacji naukowych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. W dwóch z nich, opublikowanych kolejno w: *Cancer Nanotechnology* oraz *Czech-Slovak Pharmacy* Doktorant jest pierwszym autorem. W trzeciej publikacji w *Acta Biochimica Polonica* jest jednym ze współautorów.

Ostatnią część pracy stanowi wykaz literatury, w którym znalazły się aktualne pozycje, zaczerpnięte z wiodących czasopism naukowych.

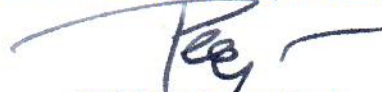


Obowiązkiem recenzenta jest również ocena formalnej strony dysertacji. Rozprawa jest napisana bardzo przejrzysto, przy użyciu poprawnego języka. Tekst jest sformatowany poprawnie, co czyni pracę bardzo czytelną. Natomiast – choć to oczywiście rzecz dyskusyjna – nie jestem zwolennikiem używania formy bezosobowej (np. „wykonano”, a nie „wykonałem”) przy redagowaniu prac doktorskich, ponieważ wprowadzać może to pewną niejasność dotyczącą tego, które badania wykonane zostały przez doktorantów osobiście, a które zlecono.

Z dołączonego do rozprawy *curriculum vitae* dowiadujemy się ponadto, że Doktorant jest współautorem łącznie sześciu recenzowanych publikacji naukowych, jednego (wspomnianego w recenzji) patentu oraz jednego zgłoszenia patentowego. Ponadto uczestniczył w jedenastu konferencjach naukowych, uzyskując wyróżnienia za przedstawiane tam prezentacje.

W mojej ocenie rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie bardzo istotnych problemów naukowych oraz potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie. Potwierdza również umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Drobne potknięcia, które wymieniłem w niniejszej recenzji nie wpływają na wysoką ocenę merytoryczną przeprowadzonych badań. Dlatego z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa mgr. Pawła Nalepy spełnia wymagania zwyczajowe i formalne stawiane rozprawom doktorskim. Wnioskuje zatem o dopuszczenie Kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK  
Pracownia Chemoinformatyki Środowiska

  
prof. dr hab. Tomasz Puzyń