

## OCENA ROZRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr Karoliny Karnas-Janoty

pt. „Surface-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for application in modern anti-cancer therapies”

wykonanej

na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego

pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Karewicz, prof. UJ oraz prof. dr hab. Joanny Dulińskiej-Litewki,  
prof. UJ

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne UAM z dnia 7 lutego 2023 roku.

### 1. Charakterystyka formalna rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Karoliny Karnas-Janoty pt. „Surface-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for application in modern anti-cancer therapies” została przygotowana w języku angielskim i oparta jest na klasycznym opisie obejmującym omówienie wyników.

Rozprawa doktorska zbudowana została w typowy sposób i zawiera rozdziały takie jak: Wstęp, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie, Spis Bibliografii, oraz Indeks Rycin i Tabel. Praca została opatrzona streszczeniem zarówno w języku angielskim, jak i polskim, jak również dołączono do niej opis osiągnięć naukowych Doktorantki.

Wstęp pracy zawiera szeroki przegląd literaturowy obejmujący omówienie zagadnień związanych z nowotworzeniem, tworzeniem przerzutów nowotworowych, szczegółową charakterystykę raka prostaty, w tym szczegółowy opis stosowanych w pracy linii komórkowych. W rozdziale tym znajduje się także opis systemów nanocząstkowych znajdujących potencjalne zastosowanie w terapii nowotworów oraz wnikliwe omówienie- głównego typu nanocząstek stosowanych w pracy- superparamagnetycznych nanocząstek z tlenkiem żelaza (SPION). Doktorantka porusza w tym rozdziale kwestie związane z takimi cechami nanocząstek jak ich właściwości magnetyczne, fizykochemiczne oraz biologiczne. Wprowadza również czytelnika w kwestie związane z metodami otrzymywania SPION, a w końcu- ich zastosowania w aplikacjach biomedycznych. Uważam, że ta część pracy została przygotowana przez mgr Karolinę Karnas-Janotę bardzo starannie z wykorzystaniem właściwych źródeł literaturowych. Rozdział ten został napisany czytelnym językiem, który doskonale wprowadza czytelnika w prezentowane prace. Jedyne, czego mi zabrakło w tej części rozprawy, to nieco lepsze przygotowanie rycin. Większość z tych, które są prezentowane, to ryciny oryginalne (właściwie cytowane), jednak Doktorantka mogła pokusić się o przygotowanie własnych rycin – oryginalnych bądź w oparciu o źródła oryginalne.

## 2. Przedmiot i cele rozprawy oraz zastosowana metodyka badawcza

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Karoliny Karnas-Janoty dotyczy spójnego tematycznie zagadnienia obejmującego badania potencjału rozwiązań z zakresu syntezy nanocząstek typu SPION w zastosowaniach biomedycznych. Doktorantka skupiła się w pracy na wykorzystaniu nanocząstek superparamagnetycznych w potencjalnej terapii raka prostaty- drugim najczęściej występującym typie nowotworu złośliwego.

Głównym celem przedłożonej do recenzji pracy było opracowanie nanocząstek superparamagnetycznych, które mogłyby posłużyć do wychwytywania krążących komórek raka prostaty oraz przyłączeniu do ich powierzchni chemioterapeutyków. Doktorantka zrealizowała go w następujących etapach:

1. synteza i funkcjonalizacja powierzchni superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza kationową (CCh) oraz anionową (Ach) pochodną chitozanu;
2. modyfikacja powierzchni nanocząstek poprzez wprowadzenie aktywnych grup tosyłowych w celu umożliwienia przyłączenia się specyficznych przeciwciał;
3. badanie aktywności nanocząstek w tzw. układach teranostycznych, tzn. połączonych z lekami cytostatycznymi- metotreksatem lub doksorubicyną, a następnie z przeciwciałami.

Celem pierwszej części pracy było poznanie właściwości fizykochemicznych oraz magnetycznych nanocząstek, a także ocena ich przydatności w terapii przeciwnowotworowej. Nanocząstki otrzymano za pomocą współstrącania tlenków żelaza w obecności polimeru CCh, natomiast SPION/Ach uzyskano poprzez dodatkowe pokrycie nanocząstek kationowych warstwą anionowego polimeru. W badaniach właściwości fizykochemicznych obejmujących wielkość, jednorodność oraz stabilność koloidalną wykorzystano techniki DLS/ELS oraz spektroskopii ATR-FTIR. Struktura krystaliczna została potwierdzona za pomocą spektroskopii XRD oraz spektroskopii Ramana. Właściwości magnetyczne natomiast zostały przez doktorantkę określone za pomocą spektroskopii Mössbauera i magnetometrii. Stabilność nanocząstek badano w medium komórkowym.

Druga część pracy miała służyć badaniom związanym z możliwościami wychwytu krążących komórek nowotworowych przez zmodyfikowane nanocząstki związane z przeciwciałami skierowanymi wobec N-kadheryny, P-kadheryny oraz PSMA. Podobnie, jak w pierwszej części pracy, wykonano analizy fizykochemiczne (DLS/ELS, ATR-FTIR) oraz badania magnetometryczne. Dodatkowo, przeprowadzono analizę morfologii nanocząstek za pomocą mikroskopii AFM. Badania właściwości biologicznych nanocząstek użytych do wychwytu krążących komórek nowotworowych zostały przeprowadzone w oparciu o takie metody jak: badanie cytotoksyczności (test MTT oraz barwienie Alamar Blue), analizę poziomu wybranych białek (Western blot), mikroskopia konfokalna do badania rozmieszczenia nanocząstek oraz cytometria przepływowa do weryfikacji ich specyficzności. Wszystkie prace wykonano na trzech liniach komórkowych raka prostaty: PC-3, DU 145 oraz LNCaP.

Ostatnia część pracy obejmowała przygotowanie nanokompleksów zawierających nanocząstki, leki cytostatyczne oraz specyficzne przeciwciała. W badaniach tych, tak jak w poprzednich podejściach, przeprowadzono analizę fizykochemiczną, a następnie wyznaczono ilość przyłączanych leków oraz wykonano profile ich uwalniania za pomocą HPLC (MTX) i spektrofluymetrii (DOX). Badania biologiczne Doktorantka przeprowadziła z użyciem dwóch linii komórkowych: PC-3 oraz DU-145 i wykorzystwała następujące techniki: test cytotoksyczności (MTT), obrazowanie rozkładu nanocząstek pod wpływem zewnętrznego pola magnetycznego oraz rozkładu przeciwciał we wnętrzu komórek za pomocą mikroskopii konfokalnej. Przyłączanie przeciwciał do funkcjonalizowanych nanocząstek zostało potwierdzone za pomocą spektroskopii XRD oraz spektroskopii ATR-FTIR.

Podsumowując, aby zrealizować założone cele badawcze, Doktorantka zastosowała szereg technik-chemicznych, biologicznych oraz biofizycznych, które moim zdaniem były odpowiednie do ich realizacji. Zostały one bardzo szczegółowo opisane w odpowiednim rozdziale „Materials and methods”.

### **3. Najważniejsze wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy**

Rozprawa przedstawia rezultaty wielu właściwie zaplanowanych prac. Najistotniejsze, moim zdaniem, wyniki uzyskane w wyniku realizacji pracy to:

1. opracowanie i optymalizacja syntezy oraz funkcjonalizacja nanocząstek typu SPION;
2. określenie właściwości biologicznych opracowanych nanokompozytów – duża biokompatybilność oraz niskie właściwości cytotoksyczne;
3. opracowanie syntezy nanocząstek wiążących wybrane przeciwciała dla selektywnego wychwytu magnetycznego komórek raka prostaty;
4. uzyskanie nanokompleksów teranostycznych stworzonych do efektywnego i specyficznego dostarczania chemioterapeutyków w leczeniu raka prostaty.

### **4. Znaczenie uzyskanych wyników**

Literatura naukowa obejmuje w tej chwili wiele prac wskazujących na potencjalne zastosowanie nanotechnologii. Szczegółowe mechanizmy działania wielu nanokompozytów pozostają wciąż jednak nieznanymi, podobnie jak ciągle brakuje doniesień pokazujących szerokie wykorzystanie rozwiązań nanotechnologicznych w medycynie. Praca mgr Karoliny Karnas-Janoty łączy w sobie zarówno elementy badań podstawowych, jak i próbę wykorzystania nanotechnologii w badaniach aplikacyjnych. Stanowi to bardzo dobry punkt wyjścia do kontynuowania prac w kierunku szerokiego, praktycznego zastosowania nanokompozytów.

### **5. Komentarze i pytania**

1. Charakterystyka nanocząstek i obrazy SEM pokazują duże agregaty nanocząstek. Czy Doktorantka może wyjaśnić jaki wpływ na przeprowadzane później badanie aktywności biologicznej mogły mieć takie agregaty? Dlaczego w SEM nie obserwowano pojedynczych nanocząstek?
2. Fig. 40 - Nanocząstki tracą tracą właściwości ferromagnetyczne na rzecz superparamagnetycznych w temperaturze 260 (-13°C). Czy ten proces jest odwracalny? Wykres pokazuje prowadzenie eksperymentu do 300K czyli ok 27°C , a cząstki mają mieć zastosowanie biologiczne. Jak wyglądają właściwości magnetyczne SPION w temperaturze 37°C (310K) i powyżej ?
3. Fig.41- moją wątpliwość wzbudził eksperyment badania gęstości optycznej nanocząstek w medium komórkowym RPMI-1640. Doktorantka wykazała, że cząstki mają ograniczoną stabilność (5 godzin), a następnie, mimo tego używała ich w eksperymentach długoterminowych, takich jak przeżywalność komórek. Czy jest możliwe, wg Doktorantki, że podniesione OD w badaniu gęstości optycznej w określonych warunkach eksperymentalnych (24 godziny, 37 °C) może być wynikiem obecności pojawiających się w pożywce bakterii? Czy Doktorantka rozważała badanie stabilności nanocząstek w serum komórkowym?
4. Czy przy pomiarach w teście MTT w końcowym etapie eksperymentu zmierzona została absorbancja samego roztworu? Czy nanocząstki, przez wzgląd na swoją budowę chemiczną, nie zaburzały tego pomiaru?

5. Na Fig. 45 Doktorantka przedstawia bardzo ładne obrazy mikroskopowe pokazujące obecność nanocząstek w komórce. Czy wiadomo, jaki jest mechanizm wnikania nanocząstek SPION do komórek?

6. Panel figur 51-53 przedstawia wyniki analiz typu Western blot dla badania białek zaangażowanych w proces przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego. Doktorantka wykonała ogromną pracę i przeprowadziła aż 87 analiz tego typu- każda dla 5 różnych ilości nanocząstek. Wyniki obejmują bardzo jasne i czytelne obrazy membran po inkubacji z odpowiednimi przeciwciałami. Ten eksperyment jednak nie został właściwie wcale skonkludowany. Brakuje analizy densytometrycznej dla tego badania oraz opisanie wpływu nanocząstek na zmiany poziomów poszczególnych białek. Bardzo szkoda, bo przeprowadzenie tego eksperymentu wymagało z pewnością od Doktorantki dużego nakładu czasu i pracy.

7. Doktorantka przeprowadziła analizę procesu migracji dla badanych komórek nowotworowych traktowanych nanocząstkami. Ponieważ nie zastosowano żadnej linii prawidłowej, pojawia się pytanie o specyficzność działania nanocząstek wobec komórek nowotworowych. Czy Doktorantka mogłaby się do tego odnieść?

8. Fig. 68- przedstawia obraz mikroskopowy efektu inkubacji nanocząstek funkcjonalizowanych przeciwciałem PSMA. Czy komórki po tej inkubacji nie ulegały agregacji?

9. Fig. 89 przedstawia wyniki testu przeżywalności MTT po inkubacji komórek z teranostycznymi kompleksami zawierającymi metotreksat oraz doksorubicynę. Jak sama Doktorantka wspomina w pracy, są to znane cytostatyki. Czym zatem wytłumaczyć można tak niski spadek przeżywalności komórek nowotworowych w tym eksperymencie? Wyniki te wskazywałyby bowiem właściwie na brak aktywności kompleksów.

## 6. Podsumowanie

W ocenianej rozprawie doktorskiej mgr Karoliny Karnas-Janoty na uwagę zasługuje połączenie prac z zakresu badań podstawowych z badaniami potencjalnie aplikacyjnymi. Bardzo podoba mi się zastosowanie połączenia metod chemicznych, biologicznych oraz biofizycznych do możliwie najbardziej rzetelnego badania właściwości stosowanych nanocząstek. Uważam, iż rozprawa doktorska stanowi bardzo dobrą podstawę do kontynuowania i poszerzenia badań w tej tematyce. Szczególnie cenne wydaje mi się tutaj rozwijanie wątku tworzenia kompleksów teranostycznych, które mogłyby w znaczący sposób wpłynąć na poprawę wyników leczenia raka prostaty.

## 7. Wniosek końcowy

W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Karoliny Karnas-Janoty spełnia wszystkie warunki stawiane kandydatom w Ustawie – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz.85 z późniejszymi zmianami). Zwracam się zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Karnas-Janoty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 04.04.23

dr hab. Katarzyna Rolle, prof. ICHB PAN