

Bydgoszcz, 22-02-2021

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Borowik

Autor: Agnieszka Katarzyna Borowik

Tytuł rozprawy: Wpływ wybranych nanocząstek węglowych i metalicznych na aktywność modelowych niskocząsteczkowych związków biologicznie czynnych

Promotor: dr hab. Jacek Piosik, prof. uczelni

Promotor pomocniczy: dr Anna Woziwodzka

Praca wykonana w Pracowni Biofizyki Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Dobór, znaczenie tematu i cel pracy

Jednym z największych wyzwań cywilizacyjnych, przed którym stoi współczesna nauka, jest poszukiwanie nowych metod leczenia nowotworów i infekcji lekoopornych. Sposobem na zwiększanie skuteczności chemioterapeutyków jest terapia skojarzona, polegająca na łączonym podawaniu substancji czynnej z modulatorem. Przedstawiona do recenzji praca doktorska wykonana została w zespole dr hab. Jacka Piosika, prof. UG, który od lat specjalizuje się w badaniach mających na celu zrozumienie mechanizmu molekularnego odpowiedzialnego za niekwalencyjne oddziaływania nanostruktur z biologicznie aktywnymi związkami niskocząsteczkowymi. Oddziaływania te pełnią kluczową rolę w projektowaniu nanostrukturalnych platform transportowych, za pośrednictwem których dostarczane są chemioterapeutyki.

Hipoteza badawcza, której zweryfikowania podjęła się Doktorantka zakładała, że nanocząstki metali (srebra i platyny) i węgla (fulerenów C₆₀) są w stanie bezpośrednio oddziaływać z modelowymi niskocząsteczkowymi związkami biologicznie czynnymi i modulować ich aktywność biologiczną. Połączenie nanostruktury stanowiącej platformę nośnikową

z transportowanym lekiem przez wykorzystanie niekowalencyjnych oddziaływań powinno zapewnić dodatkowe korzyści w postaci podtrzymywania aktywności leku oraz ułatwienie i kontrolowanie jego uwalniania w miejscu docelowym.

Ocena formalna i merytoryczna pracy

Zasadnicza część pracy doktorskiej Pani mgr. Agnieszki Borowik stanowi zbiór pięciu opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych wraz z oświadczeniami współautorów publikacji o wiodącym wkładzie autorskim Doktorantki w trzech pracach i częściowej roli w ich tworzeniu w dwóch pozostałych pracach. Załączone prace Autorka poprzedziła streszczeniem w języku polskim i języku angielskim oraz zredagowanym w języku polskim przewodnikiem po pracach. Przewodnik jest rzeczowy i syntetyczny. We wstępie Autorka omawia zagadnienia związane z syntezą nanocząstek, problematykę wielolekooporności w kontekście terapii nowotworowych oraz szans, jakie stwarza terapia skojarzona z nanocząstkami modulującymi związki biologicznie czynne. Cele pracy przedstawione w kontekście wspomnianych wyżej publikacji sformułowane zostały jasno i czytelnie. Tak więc, celami były: ocena zdolności do tworzenia heteroagregatów z wybranymi niskocząsteczkowymi związkami biologicznie czynnymi, określenie potencjału mutagennego kompleksów nanostruktura-chemioterapeutyk na ich potencjał mutageny z użyciem testu Ames, zbadanie toksyczności nanocząstek wobec ludzkich linii komórkowych nowotworowych i nienowotworowych, ocena wpływu nanocząstek platyny na żywotność oraz cykl życiowy modelowego organizmu wielokomórkowego *Caenorhabditis elegans*. Przewodnik zawiera ponadto podsumowanie wyników przedstawionych w opublikowanych artykułach, wnioski końcowe, bibliografię (176 pozycji), spis dorobku naukowego Doktorantki, spis pozostałych publikacji z udziałem Autorki niewchodzących w skład rozprawy, spis wystąpień konferencyjnych, spis grantów badawczych kierowanych przez Autorkę, a także spis nagród i wyróżnień.

Pierwsza praca z cyklu nosi tytuł „**The impact of surface functionalization on the biophysical properties of silver nanoparticles**” i została opublikowana w 2019 roku w czasopiśmie *Nanomaterials* (IF: 4.514, Pkt. MNiSW: 70). Doktorantka jest pierwszą autorką tej publikacji. Główny temat badawczy związany był z określeniem, jak funkcjonalizacja nanocząstek srebra resztami kwasu tiobarbiturowego (AgNPs-TBA) oraz resztami kwasu 11-merkaptoundekanowego (AgNPs-MUA) wpływa na ich potencjał mutageny i toksyczność oraz oddziaływanie z mutagenem akrydynowym ICR-191 będącym modelowym niskocząsteczkowym związkiem biologicznie czynnym. Wyniki pomiarów dynamicznego rozpraszania światła (DLS) oraz pomiary potencjału zeta pokazały, że kowalencyjna funkcjonalizacja nanocząstek srebra wpłynęła na skłonność do agregacji nanocząstek i obniżenie potencjału zeta. Zastosowanie izotermicznej kalorymetrii miareczkowej pozwoliło na wykazanie, że mutagen akrydynowy ICR-191 nie tworzy spontanicznie kompleksów z modyfikowanymi nanocząstkami srebra. Słabe oddziaływania zmodyfikowanych nanocząstek

z ICR-191 potwierdziły również pomiary widm fluorescencji. Wyniki testów Amesa wykonane na hodowlach bakterii *Salmonella typhimurium* TA98 nie wykazały mutagenności „nagich” oraz funkcjonalizowanych nanocząstek srebra. W pracy określono również toksyczność nanocząstek wobec unieśmiertelnionej linii komórkowej keratynocytów człowieka HaCaT (modelowa nienowotworowa linia komórkowa) oraz ludzkiej linii komórkowej czerniaka MelJuSo (modelowa nowotworowa linia komórkowa). Każda mieszanina nanocząstek nieznacznie obniżała żywotność komórek.

Druga praca z cyklu jest zatytułowana „Interactions of newly synthesized platinum nanoparticles with ICR-191 and their possible application” i opublikowana została w 2019 roku w czasopiśmie *Scientific Reports* (IF: 4.576, Pkt. MNiSW: 100). Doktorantka jest pierwszą autorką tej publikacji. Praca obejmuje zagadnienie nowej metody syntezy nanocząstek platyny umożliwiającej precyzyjną kontrolę rozmiaru w zakresie od 10 do 80 nm i kształtu nanocząstek. Uzyskane nanocząstki poddano ocenie pod kątem zastosowania ich jako platformy transportowej dla mutagenu akrydynowego ICR-191 jako modelowego chemioterapeutyka niskocząsteczkowego. Zarówno zmiany w charakterze widm UV-Vis i fluorescencji, jak również pomiary entalpii reakcji metodą izotermicznej kalorymetrii miareczkowej, wskazywały na spontaniczne formowanie się heteroagregatów nanocząstek platyny i mutagenu w roztworach buforowych. Wyniki testów Amesa wykonane na hodowlach bakterii *Salmonella typhimurium* TA98 wskazywały na znaczący spadek mutagenności ICR-191 w obecności nanocząstek platyny, co związane było z sekwestracją mutagenu przez nanocząstki. Efekt toksyczny nanocząstek platyny był znacznie wyższy wobec nowotworowej linii komórkowej czerniaka (MelJuSo) niż wobec nienowotworowej linii komórkowej keratynocytów (HaCaT) – stężenie hamujące leku (IC50) było niemal pięciokrotnie wyższe dla HaCaT niż dla MelJuSo. Natomiast przy stałym stężeniu mutagenu ICR-191 stężenie hamujące było stukrotnie wyższe dla komórek HaCaT. Stwierdzono również brak toksycznego efektu nanocząstek platyny wobec modelowych organizmów wielokomórkowych (nicień *Caenorhabditis elegans*). Przedstawione w pracy wyniki dowodzą dużego potencjału nanoplatyny jako nanotransportera chemioterapeutyków.

Trzecia publikacja składająca się na rozprawę doktorską to praca „**Does C60 fullerene act as a transporter of small aromatic molecules**” opublikowana w 2018 roku w czasopiśmie *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (IF: 4.263, Pkt. MNiSW: 35). Doktorantka jest pierwszą autorką tej publikacji. Praca dotyczy określenia potencjalnej roli fulerenów C60 jako nanonośników chemioterapeutyków. Koloidalne roztwory wodne fulerenów wytwarzane były metodą mieszania roztworu C60 w toluenie z wodą z towarzyszeniem ultradźwięków aż do całkowitego odparowania toluenu. Rozkład wielkości nanocząstek C60 wyznaczany metodą dynamicznego rozpraszania światła wskazywał na polidispersyjny charakter koloidu, w którym nastąpiła homoagregacja C60 do klastrów o rozmiarach ok. 70, 130 i 250 nm. Po wprowadzenie mutagenu akrydynowego ICR-191 rozkład wielkości nanocząstek miał tylko jedno maksimum ok. 400 nm. Parametry termodynamiczne procesu formowania agregatów

nanocząstek C60 oraz mutagenu ICR-191 wskazywały na spontaniczne formowanie się heteroagregatów. Wartości eksperymentalne ujemnej wartości entalpii reakcji agregacji zostały potwierdzone przez modelowanie molekularne, którego wyniki wskazały na mechanizm oddziaływań π -elektronowych pomiędzy aromatycznymi pierścieniami fulerenów i molekuł mutagenu. Homoagregaty C60 nie wykazywały aktywności mutagennej w odniesieniu do bakterii *Salmonella typhimurium* TA98. Aktywność biologiczna mutagenu akrydynowego ICR-191 przy odpowiednio wysokim stężeniu nanocząstek C60 była zachowana. Wyniki te podparte obrazowaniem AFM dowodzą dużego powinowactwa heteroagregatów nanocząstek C60 i mutagenu ICR-191 do ścian komórkowych bakterii.

Czwarta praca z cyklu nosząca tytuł „C60 fullerene enhances cisplatin anticancer activity and overcomes tumor cells drug resistance” ukazała się w 2017 roku w czasopiśmie *Nano Research* (IF: 8.164, Pkt. MNiSW: 45). Doktorantka pełniła częściową rolę w tworzeniu tej obszernej pracy. Tematem badawczym pracy była cytotoksyczność kompleksów fulerenów C60 i cisplatyny względem wybranych nowotworowych linii komórkowych. Formowanie się heteroagregatów fulerenów C60 i cisplatyny zostało potwierdzone przez pomiary rozpraszania promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami (SAXS). Z kolei symulacje komputerowe metodą dokowania molekularnego fulerenu C60 do glikoproteiny P (P-gp) oraz białek oporności wielolekowej (MRP-1, MRP-2) pozwoliły na wyjaśnienie mechanizmów odpowiedzialnych za wzrost aktywności biologicznej kompleksów cisplatyny i fulerenu C60. Najwyższy wzrost toksyczności kompleksów w stosunku do czystej cisplatyny występował względem linii komórkowych białaczki (HL-60/adr i HL-60/vinc). Kompleksy fulerenów i chemioterapeutyka wykazywały również wzrost toksyczności względem linii komórkowych raka okrężnicy (HCT-116) oraz raka szyjki macicy (HeLa, KB-3-1, KBC-1). Testy mutagenności wobec *Salmonella typhimurium* wskazywały na największy spadek mutagenności chemioterapeutyku przy stosunku stężeń molowych C60 do cisplatyny 1:2.4. Badania *in vivo* pokazały, że kompleksy C60 i cisplatyny stanowią bardziej skuteczny inhibitor wzrostu raka płuc Lewisa (C57BL/6J) niż każdy ze składników kompleksów stosowany oddzielnie. Tym samym udowodniony został efekt synergiczny pomiędzy cisplatyną i nanocząstkami C60, który jest wynikiem tworzenia niekowalencyjnych oddziaływań chemicznych pomiędzy składnikami heteroagregatów w warunkach fizjologicznych.

Piąta publikacja składająca się na rozprawę doktorską, to „**Biophysical characterization of the complexation of C60 fullerene with doxorubicin in prokaryotic model**”. Ukazała się ona w 2016 roku w *Materials Science and Engineering Technology* (IF: 0.744, Pkt. MNiSW: 15). Doktorantka pełniła częściową rolę w jej tworzeniu. Głównym tematem pracy było określenie możliwości powstawania heteroagregatów złożonych z mutagenu doksorubicyny i molekuł fulerenu C60 oraz ocena mutagenności kompleksów. Pomiary rozpraszania neutronów pod małymi kątami (SANS) wskazywały na wzajemne oddziaływanie molekuł doksorubicyny i fulerenu w roztworze. Skutkiem oddziaływania dodatnio naładowanych molekuł doksorubicyny był wzrost rozmiarów klastrów fulerenowych w roztworze. Testy aktywności mutagennej

względem *Salmonella typhimurium* TA98 wykazały występowanie synergii biologicznej pomiędzy doksorubicyną i fulerenami, polegającą na około 25% spadku mutagenności przy niższych stężeniach fulerenu C60 w mieszaninie oraz przywracaniu aktywności biologicznej doksorubicyny do poziomu wyjściowego przy wyższych stężeniach C60.

We „Wnioskach końcowych” przewodnika po pracach Doktorantka w 14 punktach podsumowała całość prac badawczych. Podsumowanie jest syntetyczne, wnioski w pełni uzasadnione i świadczące o dużej wiedzy teoretycznej i praktycznej oraz dużym krytycyzmie Autorki. Do najważniejszych należą stwierdzenie, że funkcjonalizacja powierzchni nanocząstek biomolekułami stanowi narzędzie do uzyskiwania nanostruktur o nowych właściwościach. Nanosrebro i fulereny C60 wykazują skłonność do homoagregacji w roztworach wodnych. Aromatyczne mutageny (mutagen akrydynowy, doksorubicyna) oddziałują z fulerenami za pośrednictwem oddziaływań stackingowych, natomiast prawdopodobny mechanizm oddziaływania cisplatyny z kompleksami fulerenów związany jest z prawdopodobnie z występowaniem sił hydrofobowych oraz van der Waalsa. Jednocześnie Autorka stwierdza, że wciąż nie ma jednoznacznego wyjaśnienia mechanizmu oddziaływania aromatycznego mutagenu akrydynowego z metalicznymi nanocząstkami srebra i platyny.

Uwagi krytyczne

Szczegółowa lektura pracy pozwoliła wyłonić jedynie nieliczne niezręczności nomenklaturowe. Autorka posługiwała się w artykułach oraz przewodniku po pracach pojęciem ‘roztworu wodnego fulerenów C60’ zamiast bardziej adekwatnego terminu ‘roztworu koloidalnego fulerenów’. W mojej opinii sformułowanie ‘nanocząstki pochodzenia metalowego’ poprawniej byłoby zastąpić sformułowaniem ‘nanocząstki metali’. Ponieważ funkcjonalizacja nanocząstek jest istotną metodą modyfikowania nanocząstek, komentarza wymagałoby również, czy Doktorantka nie rozważy w przyszłości rozszerzenia metod monitorowania procesu funkcjonalizacji nanocząstek, np. za pomocą NMR oraz SERS.

Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wysoką wiedzę teoretyczną kandydatki do stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne oraz dowodzi umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Doktorantka przedstawiła cykl pięciu powiązanych tematycznie artykułów, przy czym, zgodnie z oświadczeniami współautorów, w trzech pełniła wiodącą rolę w ich tworzeniu. Przedstawione w pracach wyniki stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w zakresie wykorzystania oddziaływań niekwalencyjnych pomiędzy nanocząstkami metalicznymi i węglowymi a niskocząsteczkowymi chemioterapeutykami poprzez wytwarzanie heteroagregatów i badanie ich aktywności biologicznej.

Poza przedstawionym cyklem artykułów o łącznym IF=22.261, Doktorantka jest współautorką w kolejnych pięciu publikacjach o łącznym IF=18.34. Swoje wyniki prezentowała podczas 9 międzynarodowych konferencji (8 posterów, 1 prezentacja ustna nagrodzona). W kolejnych 6 prezentacjach konferencyjnych występowała jako współautorka. Wykazała się również aktywnością w obszarze zdobywania środków na badania uzyskując 3 granty dla Młodych Pracowników Nauki MNiSW. Bardzo dużym osiągnięciem był prestiżowy staż w USA w ramach Visiting Research Graduate Traineeship Program (BioLAB). Doktorantce dwukrotnie przyznano stypendium dla najlepszych doktorantów Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed.

Wobec powyższego stwierdzam, że oceniana praca Pani mgr Agnieszki Borowik pt. „Wpływ wybranych nanocząstek węglowych i metalicznych na aktywność modelowych niskocząsteczkowych związków biologicznie czynnych” **w pełni spełnia kryteria przypisane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668) i z pełnym przekonaniem wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Borowik do obrony rozprawy doktorskiej.**

Jednocześnie wysoka ocena merytoryczna pracy, rzetelność badań i analiz oraz jakość publikacji w renomowanych czasopismach oraz bogaty dorobek naukowy Doktorantki skłaniają mnie do wystąpienia do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego z wnioskiem **o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Borowik.**

Bydgoszcz, 22.02.2021


Paweł Szroeder