



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Zakład Farmakokinetyki i Terapii Monitorowanej

70-111 Szczecin, al. Powstańców Wlkp. 72

tel. 91 466 15 89, fax 91 466 16 00, email: farmakol@pum.edu.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Krzysztofa Jacka Cendrowskiego pt.: „**Synteza i funkcjonalizacja nanostruktur molekularnych do biozastosowań**” wykonanej w Zakładzie Nanotechnologii w Instytucie Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Mijowskiej.

W XXI wieku obserwowany jest intensywny rozwój różnych gałęzi nanotechnologii, wśród których wyróżnia się nanomedycynę. Wykorzystuje ona nanocząstki i nanomateriały w takich dziedzinach jak: nanodiagnostyka, nanofarmakologia i nanoonkologia. Jedną z najlepiej rozwijających się dziedzin nanomedycyny jest nanofarmakologia, która zajmuje się tworzeniem nanosystemów nośnikowych umożliwiających selektywne dostarczenie leku do miejsca działania oraz jego sterowanym uwalnianiem w patologicznych komórkach lub tkankach. Do zadań nanofarmakologii należy także tworzenie nowych nanoleków oraz udoskonalanie już istniejących, również struktur o właściwościach przeciwbakteryjnych. Głównym celem badań w ostatnim czasie jest stworzenie wielofunkcyjnych nanocząstek i nanomateriałów, których właściwościami można byłoby sterować w organizmie za pośrednictwem lokalnego środowiska lub czynników zewnętrznych, np. używając zewnętrznego pola magnetycznego czy światła UV.

Rozprawa doktorska pana mgr inż. Krzysztofa Jacka Cendrowskiego jest obszernym studium dotyczącym syntezy oraz analizy właściwości fizykochemicznych nanostruktur utworzonych na bazie związków nieorganicznych, takich jak: krzemionka, węgiel oraz dwutlenek tytanu, a także ich potencjalnego zastosowania w medycynie, szczególnie w onkologii i mikrobiologii. Temat podjętych badań jest bardzo aktualny. Nadzieje związane z

nanomedycyną są tak wielkie, że wielu badaczy na całym świecie pracuje nad udoskonaleniem tych struktur i zwiększeniem kompatybilności z naturalnymi związkami organizmu ludzkiego, by były nietoksyczne i biodegradowalne. Wartość podjętych przez mgr Krzysztofa Cendrowskiego badań dokumentują prace, które powstały na podstawie tej rozprawy, opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym z listy filadelfijskiej, których Doktorant jest współautorem.

Treść przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej liczącej 218 stron, wzbogaconej 1 tabelą i 94 rycinami, została podzielona na dwie części, tzw. literaturową i eksperymentalną. W bardzo obszernej części teoretycznej (około 90 stron), przygotowanej w oparciu o najnowszą literaturę i bogate piśmiennictwo (393 pozycje), Autor zapoznaje czytelnika z nanomateriałami wykorzystywanymi w medycynie, opisując szczegółowo budowę i właściwości fizykochemiczne oraz metody syntezy i modyfikacji nanostruktur krzemionkowych, nanorurek węglowych oraz nanostruktur z dwutlenkiem tytanu. Na podstawie dostępnych badań *in vitro* oraz *in vivo* omawia również toksyczność tych nanomateriałów. Autor słusznie zauważa, że brak wystandaryzowanych metod oraz wytycznych dotyczących badania toksyczności utrudnia ocenę wpływu nanomateriałów na żywy organizm. Doktorant wiele uwagi poświęcił wykorzystaniu nanomateriałów w celowanej terapii przeciwnowotworowej, a szczególnie kontrolowanemu uwalnianiu cytostatyków w miejscu działania oraz wykorzystaniu nanocząstek w terapiach wspomagających leczenie nowotworów, takich jak hipertermia i terapia fotodynamiczna. Autor opisał także wykorzystanie nanostruktur o właściwościach bakteriobójczych, zbudowanych na bazie dwutlenku tytanu, srebra lub miedzi w medycynie oraz ochronie środowiska. Ostatni rozdział części literaturowej rozprawy został poświęcony technikom stosowanym do obrazowania struktury nanomateriałów oraz analizom umożliwiającym ocenę jakościową i ilościową nanocząstek. Taki układ rozprawy ma swoje uzasadnienie, gdyż stanowi podstawę teoretyczną do badań przeprowadzonych w części eksperymentalnej. Część teoretyczna rozprawy została przedstawiona bardzo szczegółowo i obszernie, co świadczy o rozległej wiedzy Autora w zakresie zagadnień będących przedmiotem Jego badań.

Do tej części pracy mam następujące uwagi natury redakcyjnej. Praca została przygotowana niezbyt starannie. Doktorant nie ustrzegł się licznych błędów stylistycznych i literowych. Niektóre z nich przytoczę, np. w spisie treści - podrozdział 1.1.2.1. powinien być zatytułowany: „Metody syntezy nanostruktur krzemionkowych”, na str. 36 powinno być klastry zamiast klastery, na str. 39 i 40 zamiast podanie dotchawiczne – poprawnie jest dotchawicze, na str. 42 zamiast nanomateryczny dwutlenek tytanu powinno być

nanometryczny; na str. 52 określenie apoptoza śledzony jest nieprawidłowe, gdyż apoptoza jest zaprogramowaną śmiercią komórki, podobnie jak anemia czerwonych krwinek, ponieważ anemią określa się niedobór krwinek czerwonych; zamiast neutrofilowe poprawnie powinno być komórki neutrofilowe, itd. Ponadto na str. 59 nie podano numeru ryciny tylko XX, a powinno być 31; na str. 70 Autor napisał: „, jako uzupełnienie tradycyjnych metod leczenia takich jak chirurgia, chemioterapia czy radioterapia”, chirurgia jest kliniczną dziedziną medycyny zajmującą się leczeniem operacyjnym; strony 83, 84 i 85 zostały przestawione; w tytułach, np. rozdziałów, nie stawia się kropek; na str. 83 brak ryciny oznaczonej numerem V – schemat budowy transmisyjnego mikroskopu elektronowego.

Celem podjętych badań przez pana mgr inż. Krzysztofa Jacka Cendrowskiego była synteza i analiza właściwości fizykochemicznych nanaostruktur, które można zastosować w medycynie jako materiał o właściwościach przeciwbakteryjnych oraz jako nośnik leków przeciwbakteryjnych i cytostatyków w tzw. terapii celowanej. Część eksperymentalna rozprawy doktorskiej składała się z trzech części.

W części pierwszej Doktorant opracował syntezę litych rdzeni nanosfer krzemionkowych według wcześniej opisanej metody Stöbera, opartej na reakcji zol-żel i procedurę pokrywania litego rdzenia porowatą warstwą krzemionki. Strukturę otrzymanych litych i mezoporowatych nanosfer krzemionkowych badał przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej. W celu zwiększenia reaktywności otrzymanych nanostruktur ich powierzchnię modyfikowano grupami aminowymi wprowadzonymi przez pokrycie monowarstwą 3-aminopropylotrietoksylsilanu (APTES). Stosując analizę dyfrakcji promieni rentgenowskich potwierdzono obecność atomów azotu w otrzymanych nanosferach. Do oceny cytotoksyczności otrzymanych nanostruktur Doktorant zastosował test biokompatybilności na fibroblastach mysich linii L929. Przeprowadzony test, w którym oceniano ilość aktywnych metabolicznie komórek, nie wykazał toksycznego działania badanych nanocząstek w zakresie stężeń 3,125-50µg/ml. W teście oceniającym cytotoksyczność z odczynnikiem WST1 ocenia się absorbancję a nie poziom fluorescencji, jak napisał Doktorant (str.103). Otrzymane mezoporowate nanosfery krzemionkowe zostały wykorzystane jako nośnik dla chloramfenikolu, który wybrano jako lek modelowy spośród antybiotyków o działaniu bakteriostatycznym. Chloramfenikol umieszczano w kanalikach mezoporowatej otoczki nanosfer krzemionkowych, co zostało udokumentowane badaniem próbek w elektronowym mikroskopie transmisyjnym oraz potwierdzone badaniem analizy dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego wykonanym detektorem EDS. Stosując analizą termogravimetryczną mezoporowatych nanosfer krzemionkowych wypełnionych

chloramfenikolem Doktorant określał procentową zawartość leku w badanych próbkach. Zbadał także kinetykę uwalniania chloramfenikolu z mezoporowatej otoczki nanosfer krzemionkowych za pomocą spektrometrii UV-Vis. Autor nie podał w pracy do jakiego „medium” uwalniał się chloramfenikol. Skuteczność przeciwbakteryjną uwolnionego z mezoporowatych nanosfer krzemionkowych chloramfenikolu badano w układzie *in vitro* w hodowli bakterii *Escherichia coli* na podłożu płynnym i stałym. Autor wykonał także test cytotoksyczności używając fibroblastów mysich linii L929 dla tych nanostruktur (moja uwaga: używa się określenia fibroblaty mysie linii L929, a nie fibroblasty mysiego naskórka, ponieważ w naskórku występują keratynocyty, zaś fibroblasty są komórkami skóry właściwej; podobny błąd popełniony został w użyciu nazewnictwa komórek ludzkiej skóry). Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorant uzyskał oryginalne wyniki, które podsumował 6 prawidłowymi wnioskami.

Drugi etap badań dotyczył modyfikacji tlenkiem tytanu mezoporowatych nanocząstek krzemionkowych. Autor wybrał dwutlenek tytanu, gdyż związek ten charakteryzuje się właściwościami przeciwbakteryjnymi powstającymi pod wpływem promieniowania ultrafioletowego. Gdy na nanocząstki z dwutlenkiem tytanu działa promieniowanie UV, powstają reaktywne formy tlenu. Z tego powodu związek jest wykorzystywany do tworzenia powłok antybakteryjnych oraz do oczyszczania ścieków. Doktorant zastosował test modelowej reakcji rozkładu fenolu dla potwierdzenia fotoaktywności mezoporowatych nanosfer krzemionkowych modyfikowanych dwutlenkiem tytanu oraz test *in vitro* z bakteriami *Escherichia coli* dla potwierdzenia właściwości przeciwbakteryjnych indukowanych światłem UV otrzymanych nanocząstek. Analiza widma za pomocą spektrometrii UV-Vis wykazała, że próbki o największej fotoaktywności powstały przy zastosowaniu światła UV jako aktywatora, w zakresie temperatur krystalizacji dwutlenku tytanu 400°C - 500°C. Badania nad syntezą i zastosowaniem mezoporowatych nanocząstek krzemionkowych modyfikowanych dwutlenkiem tytanu Autor podsumował 5 wnioskami.

W drugiej części tego etapu Autor opracował syntezę mezoporowatych nanorurek krzemionkowych z wykorzystaniem nanorurek węglowych jako matrycy, które modyfikował dwutlenkiem tytanu. Biorąc pod uwagę fakt, że nanostruktury cylindryczne ze względu na dużą powierzchnię właściwą i cylindryczny kształt mogą w większym stopniu penetrować do komórek mikroorganizmów. Właściwości fizykochemiczne otrzymanych nanorurek Doktorant badał używając metody transmisyjnej i skaningowej mikroskopii elektronowej, spektroskopii EDS oraz dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego. Badania wykazały, że struktura nanorurek i nanosfer krzemionkowych modyfikowanych dwutlenkiem tytanu jest

zbliżona. Do badania właściwości przeciwbakteryjnych nanorurek krzemionkowych Doktorant zastosował te same testy jak w przypadku nanosfer krzemionkowych modyfikowanych dwutlenkiem tytanu. Dodatkowo Autor analizował *in vitro* właściwości przeciwgrzybiczne mezoporowatych nanorurek krzemionkowych modyfikowanych dwutlenkiem tytanu. Badania przeprowadzono w hodowli dwóch patogenicznych gatunków grzybów z rodziny *Pseudallescheria boydii* na płytkach z podłożem agarowym. Badania wykazały wysoką skuteczność przeciwgrzybiczą badanych nanorurek aktywowanych sztucznym światłem widzialnym. Wyniki tej części badań Autor podsumował 7 prawidłowymi wnioskami.

Ostatnim etapem badań była synteza nanokapsulek zbudowanych z nanorurek węglowych zamkniętych nanosferami krzemionkowymi oraz mezoporowatymi nanosferami krzemionkowymi modyfikowanymi dwutlenkiem tytanu, które mogłyby być wykorzystane do transportu i kontrolowanego uwalniania cytostatyków stosowanych w terapii przeciwnowotworowej. Doktorant opracował oryginalną metodę zamykania nanorurek węglowych za pomocą wiązania amidowego, które powstało w wyniku reakcji pomiędzy grupami aminowymi obecnymi na powierzchni nanosfery i grupami karboksylowymi obecnymi na otwartych końcach nanorurek. Zastosowanie mezoporowatych nanosfer krzemionkowych modyfikowanych dwutlenkiem tytanu w takim systemie umożliwiło zerwanie wiązań pod wpływem promieniowania UV pomiędzy grupami aminowymi i karboksylowymi i uwalnienie leku z wnętrza takiego systemu. Strukturę i średnice otrzymanych nanokapsulek analizowano przy użyciu spektrometrii EDS oraz TEM. Nie wykazano różnic pomiędzy skutecznością i stabilnością wiązania w nanokapsułkach zamykanych litymi nanosferami krzemionkowymi a mezoporowatymi nanosferami krzemionkowymi modyfikowanymi dwutlenkiem tytanu. Jako substancje modelowe do badania stabilności i kontrolowanego uwalniania substancji z przygotowanych nanokapsulek Doktorant wybrał błękit brylantowy oraz metotrekst (cytostatyk stosowany w leczeniu wielu chorób immunologicznych i nowotworowych). W rozdziale 9.6. Autor opisał badania dotyczące stabilności i czasu uwalniania nanokapsulek wypełnionych błękitem brylantowym w zależności od temperatury w środowisku wodnym o różnych wartościach pH oraz w hodowli z komórek ludzkich linii WS1 (określenie „w medium do hodowli komórkowej” nie jest poprawne; powinno być: badanie prowadzono na hodowli komórkowej z komórek ludzkich fibroblastów linii WS1). Opisując tę część badań, Autor napisał na str. 159: cyt.: „Za pomocą fluorescencji określano nie tylko ilość uwolnionego barwnika, ale również zmiany liczby żywych komórek. Z rys. 92a oraz 92b wynika, że nanokapsułki nie wpływają

negatywnie na żywotność komórek mysiego naskórka (?) oraz, że wraz z upływem czasu nie dochodzi do naruszenia integralności nanokapsulek, czego konsekwencją był brak zwiększenia stężenia barwnika”. Natomiast z podpisu pod ryciną 92a wynika, że na wykresie przedstawiono względną biokompatybilność nanokapsulek wypełnionych metotreksatem inkubowanych z fibroblastami ludzkimi linii WS1. Jeżeli to były nanokapsułki wypełnione metotreksatem, to nie można mówić o biokompatybilności tylko o cytotoksyczności względem tych komórek. Autor nie wspominał wcześniej o badaniu nanorurek wypełnionych metotreksatem w tym układzie.

Badanie kinetyki kontrolowanego uwalniania metotreksatu i barwnika brylantowego z nanorurek węglowych zamkniętych nanosferami krzemionkowymi modyfikowanymi dwutlenkiem tytanu prowadzono z wykorzystaniem światła UV jako czynnika inicjującego otwieranie tych nanokapsulek. Doktorant wykazał, że zastosowanie nanocząstek krzemionkowych modyfikowanych dwutlenkiem tytanu do zamykania nanokapsulek pozwala na kontrolowane otwieranie ich pod wpływem światła UV, a wydłużenie czasu naświetlania pozwala na uwolnienie większej ilości leku. Badania zostały podsumowane 5 wnioskami sformułowanymi na podstawie uzyskanych wyników.

We wniosku numer 3 Doktorant nie powinien używać określenia „medium” ponieważ niejasne jest jakiego medium to dotyczyło?

Do tej części pracy mam dodatkowe uwagi, głównie natury redakcyjnej: nie używa się określenia „uśmiercanie komórek”, na str. 115 powinien być odnośnik do rozdziału 5.4 a nie 5.3; w rozdziale 1.3 (str. 115) nie opisano pomiaru aktywności mitochondrialnej, jak napisał Autor, zaś podano tę informację w rozdziale 5.4; na str. 101 akapit dotyczący ryciny 56, próbek modyfikowanych dwutlenkiem tytanu oraz APTES jest nie na temat i powinien być umieszczony w rozdziale 7 na str. 118; rozdział 9.4. na str. 153 zamieszczono dwukrotnie.

Część eksperymentalna została zakończona rozdziałem „Podsumowanie i wnioski”, w której Autor napisał, że dyskusje wyników i wnioski dotyczące szczegółowych wyników badań przedstawiono na zakończenie każdego rozdziału przedstawiającego badania w poszczególnych częściach pracy doktorskiej. Autor omówił uzyskane wyniki, ale w dyskusji tej nie porównywał ich z wynikami uzyskanymi przez innych Autorów. Przeprowadzone badania podsumowano 7 ogólnymi wnioskami.

W aspekcie wykonawczym praca zasługuje na uznanie. Trzeba podkreślić, że część doświadczalna dotyczyła bardzo zaawansowanych badań i metod analitycznych. Wszystkie procedury postępowania zostały udokumentowane zdjęciami i wykresami, co potwierdza wiarygodność uzyskanych wyników. Przedstawione wyniki badań są oryginalnym i

interesującym wkładem Autora w rozszerzenie wiedzy na temat metod syntezy i modyfikacji nanostruktur krzemionkowych, nanorurek węglowych oraz nanostruktur krzemionkowych z dwutlenkiem tytanu i ich wykorzystania w medycynie i mikrobiologii.

Po zapoznaniu się z całością pracy należy podkreślić, że realizacja tej interesującej tematyki wymagała od Doktoranta umiejętności posługiwania się najnowszymi technikami analitycznymi wykorzystywanymi do badania struktury i właściwości nanocząstek, wiedzy z zakresu nanotechnologii oraz wykorzystywania nanostruktur w medycynie. Przytoczone przeze mnie uwagi, głównie natury redakcyjnej, nie wpływają na merytoryczną wartość tej rozprawy, którą oceniam wysoko.

Podsumowując, oceniam rozprawę doktorską Pana mgr inż. Krzysztofa Jacka Cendrowskiego pozytywnie, a moje zastrzeżenia dotyczą poprawności językowej i niektórych określeń naukowych. Potwierdzeniem wartości naukowej uzyskanych wyników są publikacje w renomowanych czasopismach naukowych, których Doktorant jest współautorem.

Stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. Krzysztofa Jacka Cendrowskiego pt.: „Synteza i funkcjonalizacja nanostruktur molekularnych do biozastosowań” odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim. Dlatego zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o dopuszczenie pana mgr inż. Krzysztofa Jacka Cendrowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Szczecin, 14 maj 2015r.

KIEROWNIK
Zakładu Farmakokinetyki
i Terapii Monitorowanej

prof. dr hab. Barbara Gawrońska-Szklarz