



Kraków, 10.10.2022 r.

dr hab. inż. Małgorzata Jasiurkowska-Delaporte, prof. IFJ PAN
Instytut Fizyki Jądrowej PAN
ul. Radzikowskiego 152, 31-342, Kraków
email: Malgorzata.Jasiurkowska-Delaporte@ifj.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Elżbiety Gumieniczek-Chłopek
„Nanokapsuły polimerowe z magnetycznym rdzeniem do zastosowań biomedycznych”**

Recenzowana rozprawa doktorska powstała pod opieką pana prof. dr. hab. Czesława Kapusty w Katedrze Fizyki Ciała Stałego Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej oraz pana prof. dr. hab. Szczepana Zapotocznego w Zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Praca ma charakter interdyscyplinarny i obejmuje badania z zakresu nauk fizycznych, chemicznych oraz biologicznych. Jej celem było otrzymanie oraz scharakteryzowanie nośników w postaci biopolimerowych kapsuł przeznaczonych do celowanego oraz magnetycznie kontrolowanego dostarczania substancji biologicznie aktywnych. Podjęta przez Doktorantkę tematyka jest bardzo ważna i ciekawa zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia. Rozprawa powstała dzięki wsparciu finansowemu w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój oraz grantu dziekańskiego Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH. Część badań została sfinansowana z programu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” w AGH. Uzyskane rezultaty zostały przedstawione w trzech artykułach opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej. Wyniki pracy doktorskiej zostały również zaprezentowane w formie plakatów na 5 konferencjach krajowych i 4 konferencjach międzynarodowych oraz w formie referatu na jednej konferencji krajowej. Doktorantka odbyła krótki staż naukowy w Instytucie Nanonauki w Saragossie, Hiszpania.

Dysertacja ma postać 139 stronicowej monografii, włączając w to streszczenie w języku polskim i angielskim, bibliografię, spis rysunków i tabel oraz opis dorobku naukowego Doktorantki. Streszczenie zawiera jasno sprecyzowany cel pracy oraz hipotezę badawczą. „Część literaturowa” składająca się z czterech rozdziałów stanowi dla czytelnika bardzo dobre wprowadzenie do zagadnień związanych z przedmiotem rozprawy. Praca rozpoczyna się krótkim wprowadzeniem do tematyki polimerów. Następnie zaprezentowane zostały podstawowe własności fizyczne nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza, metody ich otrzymywania oraz zastosowania nanocząstek w biomedycynie. W dwóch ostatnich rozdziałach części literaturowej omówiono zagadnienia związane z nośnikami do



INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ
im. Henryka Niewodniczańskiego
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

celowanego i kontrolowanego uwalniania substancji biologicznie czynnych. Szczególną uwagę Autorka poświęciła układom sterowanym zewnętrznym polem magnetycznym.

Najważniejszą częścią rozprawy jest bez wątpienia „Część doświadczalna” składająca się z czterech rozdziałów, w których Doktorantka prezentuje wykonane w ramach pracy doktorskiej badania. Przeprowadzone prace obejmowały syntezę związków oraz nanocząstek magnetycznych niezbędnych do wytworzenia kapsuł polimerowych opartych na ciekłych olejowych rdzeniach z enkapsulowanymi nanocząsteczkami magnetycznymi, szczegółową charakterystykę fizykochemiczną otrzymanych materiałów oraz badania komórkowe. W pierwszej kolejności została wykonana dwuetapowa modyfikacja chitozanu polegająca na przyłączeniu grup kationowych oraz hydrofobowych łańcuchów n-dodecyłowych. Stopień podstawienia chitozanu grupami aminowymi odpowiadającymi za kationowy charakter związku został wyznaczony za pomocą miareczkowania konduktometrycznego natomiast stopień podstawienia grupami hydrofobowymi określono na podstawie analizy intensywności sygnałów w widmie $^1\text{H-NMR}$. Otrzymane produkty zostały wykorzystane do przygotowania kationowych kapsuł opartych na olejowych ciekłych rdzeniach z enkapsulowanymi nanocząsteczkami magnetycznymi. W celu uzyskania kapsuł wykazujących ujemny ładunek powierzchniowy przeprowadzono anionową modyfikację chitozanu poprzez przyłączenie grup sulfaminowych. Poprawność syntezy została potwierdzona za pomocą spektroskopii w podczerwieni (FTIR), z kolei stopień podstawienia chitozanu grupami anionowymi wyznaczono na podstawie analizy elementarnej. Ostatnim elementem prac z zakresu syntez było otrzymanie nanocząstek tlenków żelaza z powłoką hydrofobową. Uzyskane nanocząstki zostały poddane szczegółowej charakterystyce fizykochemicznej szeregiem metod eksperymentalnych. Obrazowanie przy użyciu skaningowo-transmisyjnego mikroskopu elektronowego wykazało, że nanocząstki mają kształt sferyczny a ich średni rozmiar wynosi 15 nm. Odłożenie się warstwy kwasu oleinowego na powierzchni nanocząstek potwierdziło występowanie pasma chelatowego w widmie FTIR oraz analiza termiczna TGA-DSC. Na podstawie badań strukturalnych przy pomocy rentgenowskiej dyfraktometrii proszkowej (XRD) wywnioskowano, że rdzeń otrzymanych nanocząstek stanowi wurstyt, natomiast powłoka utworzona jest z innej fazy tlenku żelaza. Analiza widm moessbauerowskich zmierzonych w różnych temperaturach doprowadziła do wniosku, że drugą obecną w nanocząstkach fazą tlenku żelaza jest maghemit. Superparamagnetyczne właściwości nanocząstek w temperaturze pokojowej zostały potwierdzone zarówno przez badania moessbauerowskie jak i pomiary przy użyciu magnetometru. Kolejnym etapem badań była optymalizacja procesu otrzymywania kationowych i anionowych kapsuł polimerowych opartych na ciekłych rdzeniach olejowych tak, aby otrzymać stabilne nośniki o odpowiednim rozmiarze, posiadające w swoim rdzeniu jak największe stężenie nanocząstek magnetycznych. Kapsuły o dodatnim ładunku powierzchniowym zostały otrzymane w oparciu o zjawisko samoorganizacji amfifilowych polimerów szczepionych natomiast układy posiadające ujemny ładunek powierzchniowy uzyskano poprzez nałożenie na powierzchnie kapsuł kationowych warstwy chitozanu zmodyfikowanego grupami anionowymi. Uzyskane układy charakteryzują się dużą stabilnością. Średnie wielkości średnic hydrodynamicznych kapsuł kationowych mierzonych w ciągu 48 tygodni mieściły się w zakresie 140 nm – 170 nm



a w przypadku kapsuł anionowych wynosiły 140 nm – 230 nm. Natomiast wartość potencjału dzeta wahała się w granicach 30 i 40 mV dla układów kationowych oraz -35 do -45 mV dla układów anionowych. Obecność nanocząstek magnetycznych we wnętrzu nośników potwierdziły zdjęcia cryo-TEM oraz zdjęcia wykonane mikroskopem konfokalnym dla próbek posiadających dodatkowo w olejowym rdzeniu hydrofobowym barwnik fluorescencyjny. Ostatni etap prac miał na celu zweryfikowanie aplikacyjnego potencjału wytworzonych kapsuł. Na podstawie tekstu cytotoksyczności kapsuł o dodatnim i ujemnym ładunku powierzchniowym względem komórek nowotworowych linii 4T1 wybrano stężenie nie powodujące negatywnej odpowiedzi komórkowej. Następnie wykonano eksperymenty mające na celu sterowanie nośnikami do wnętrza komórek nowotworowych zewnętrznym stałym polem magnetycznym pochodzącym z magnesu neodymowego. Uzyskane rezultaty dowodzą, że zastosowanie stałego pola magnetycznego wspomaga proces wnikania kapsuł do wnętrza komórek. Z kolei użycie zmiennego pola magnetycznego skutkuje zwiększeniem efektywności przechodzenia kapsuł kationowych przez błonę komórkową a w przypadku kapsuł anionowych prowadzi do uwolnienia enkapsulowanej substancji we wnętrzu komórki.

Rozprawa mgr Elżbiety Gumieniczek-Chłopek jest zredagowana w sposób przejrzysty i staranny. Z obowiązku recenzenta zebrałam pewne nieścisłości na które natrafiłam podczas lektury pracy doktorskiej

-str. 13, „GMR – sensor magnetorezystywny „powinno być „gigantyczny magnetoopór”

- str. 14, „ZFC – krzywa podatności magnetycznej w funkcji temperatury mierzona w warunkach grzania w stałym zewnętrznym polu magnetycznym uprzednio schłodzonej próbki” powinno być „krzywa podatności magnetycznej zmierzona podczas ogrzewania po uprzednim schłodzeniu próbki w zerowym polu magnetycznym”

-str. 16, „przy różnych temperaturach” zamiast „w różnych temperaturach”.

- str. 62 odpowiedni mechanizm uwalniania może zostać zainicjowany przez różne zjawiska fizykochemiczne” powinno być „różne czynniki zewnętrzne”

-str. 80, Rysunek 26, powinno być „wzrost kryształu” zamiast „kryształizacja”. Brakuje również w tekście komentarza informującego dlaczego rozdzielenie etapu nukleacji i wzrostu kryształu odgrywa istotną rolę w przeprowadzonej syntezie nanocząstek tlenków żelaza,

- str. 82 „układy posiadający ujemny” zamiast „posiadające”

- str. 104, „Analogiczne pomiary wykonano dla kapsuł kationowych” powinno być „anionowych”

- numeracja podrozdziałów w rozdziale 2 części literaturowej jest niekonsekwentna.

W rozprawie zabrakło w mojej opinii również informacji o wkładzie Doktorantki w realizację poszczególnych badań. W związku z tym chciałabym prosić Doktorantkę o krótkie wyjaśnienie tej kwestii podczas obrony.

Powyższe uwagi krytyczne nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny przedstawionej pracy.



INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ
im. Henryka Niewodniczańskiego
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Na zakończenie chciałam podkreślić, że rozprawa pani mgr Elżbiety Gumieniczek-Chłopek zawiera bogaty i oryginalny materiał doświadczalny. Wyniki badań przedstawione w rozprawie pokazują, że Autorce udało się uzyskać bardzo obiecujące w kontekście terapii celowanych nośniki sterowane zewnętrznym polem magnetycznym. Na uwagę zasługuje fakt, iż realizacja tematu niemiejszej pracy doktorskiej była zadaniem bardzo ambitnym, wymagała opanowania szeregu metod syntez chemicznych oraz dużej liczby eksperymentalnych metod fizykochemicznych i metodyki badań biologicznych. Uważam, że przesłana do recenzji rozprawa czyni za dość wymogom stawianym pracą doktorskim. Z pełnym przekonaniem kieruję wniosek do Rady Dyscypliny Nauk Fizycznych Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie o dopuszczenie pani mgr Elżbiety Gumieniczek-Chłopek do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

*Małgorzata
Jasiurkowska-Delaporte*

dr hab. inż Małgorzata Jasiurkowska-Delaporte, prof. IFJ PAN