

Łódź 16 czerwca 2016

Dr hab. Maria Zabłocka
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
Łódź, Sienkiewicza 112
e-mail zabloc@cbmm.lodz.pl

Recenzja pracy doktorskiej
mgr Małgorzaty Ferenc
“Właściwości biologiczne
funkcjonalizowanych krzemionek mezoporowatych typu SBA”

Promotor prof. dr hab. Maria Bryszewska

Recenzję wykonano dla Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Dynamiczny rozwój nauk biologicznych i medycznych zmierza w kierunku poszukiwania nowych rodzajów terapii leczenia wielu chorób. Bardzo ważnym problemem jest dostarczenie leku bezpośrednio do chorych komórek i uwolnienie go w miejscu docelowym. Nanomedycyna to nowa dziedzina wiedzy wykorzystująca nanotechnologię dla potrzeb medycznych. Obecnie w medycynie prowadzone są badania nad wykorzystaniem polimerów, dendrymerów również takich materiałów jak: nanowłókna, nanoczipty, nanorórki i wiele innych. W większości powinny one być biokompatybilne, rozpuszczalne w wodzie i nietoksyczne dla zdrowych komórek. Znalezienie idealnej struktury spełniającej te wszystkie właściwości jest bardzo trudne.

Nanocząsteczki krzemionki są materiałem inertnym i mogą być stosunkowo łatwo modyfikowane. Mezoporowe krzemionki stosowane jako nośniki nadają się do dostarczania leków słabo rozpuszczalnych w wodzie szczególnie przeciwnowotworowych które w większości są słabo rozpuszczalne i niestabilne. Przedstawiona mi do oceny praca doktorska pani mgr Małgorzaty Ferenc wykonana została pod kierunkiem Prof. dr hab. Marii Bryszewskiej, która z dużym powodzeniem zajmuje się zastosowaniem dendrymerów w medycynie jako nośników leków przeciwnowotworowych, a także jako czynników rozbijających białkowe agregaty występujące w chorobach neurodegeneracyjnych.

Cel i zakres pracy

Celem pracy Pani mgr. Małgorzaty Ferenc jest charakterystyka funkcjonalizowanych krzemionek mezoporowatych typu SBA.n

Postawiony cel pracy został zrealizowany przez Doktorantkę poprzez scharekteryzowanie morfologii krzemionek, zbadanie ich toksyczności względem erytrocytów a także linii

komórkowych prawidłowych i nowotworowych. Zbadane zostały także oddziaływania pomiędzy nanocząsteczkami a białkiem obecnym we krwi ludzkiej.

Wybór tematu dysertacji należy uznać za niezwykle trafny i uzasadniony biorąc pod uwagę obecny stan wiedzy w tej dziedzinie.

W pracy badano cztery mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe typu SBA-15

- SBA-OH - natywna krzemionka, posiadająca na swojej powierzchni jedynie grupy hydroksylowe
 - SBA-SH - krzemionka z grupami tiolowymi na powierzchni
 - SBA-NH₂ - krzemionka z grupami aminowymi na powierzchni
 - SBA-COOH - krzemionka z grupami karboksylowymi na powierzchni
- oraz krzemionkę amorficzną. a-SiO₂

Cytotoksyczność krzemionek badana była w stosunku do komórek linii prawidłowych B-14 (fibroblasty chomika chińskiego) oraz komórek linii nowotworowych HL-60 (linia ludzkich komórek ostrej białaczki szpikowej), 1301 (linia ludzkiej ostrej białaczki komórek T), BRL (szczurze komórki raka wątroby)

Dysertacja Pani mgr. Małgorzaty Ferenc zredagowana została w tradycyjnej formie obejmuje ona 93 strony. Otwiera ją rzetelny, kompletny przegląd literatury obejmujący najnowsze badania dotyczące zastosowania nanocząsteczek krzemionkowych w naukach biomedycznych. Sądzę, że mimo część literaturowa nie jest zbyt rozbudowana stanowi ona bardzo dobre uzasadnienie podjętej tematyki. (str. 8-20).

Dalej Doktorantka w sposób bardzo zwięzły a jednocześnie precyzyjny przedstawia uzasadnienie podjęcia tematu oraz cel pracy (str. 21-22).

Kolejny rozdział to „Materiały i Metody” (str. 23-37). Precyzyjnie opisane metody badań w sposób bardzo dostępny i jasny pozwalają śledzić wyniki badań, a jednocześnie świadczą o dobrej znajomości stosowanych metod a także umiejętności interpretowania wyników.

Także wykaz skrótów i symboli przedstawiony na (str. 6-7) w wersji angielskiej i polskiej jest pomocny w lekturze dysertacji.

Najobszerniejszy rozdział czwarty (str. 38-61) i kolejny (str. 62-72) zawierają przedstawienie wyników badań i ich dyskusję.

Na początku autorka zajmuje się badaniami hemotoksyczności nanocząsteczek krzemionkowych. Znajomość biokompatybilności nanocząsteczek we krwi jest niezwykle ważna ponieważ użycie ich jako leków czy też nośników leków często odbywa się poprzez bezpośrednie wstrzykiwanie do krwioobiegu co powoduje, że już na tym etapie mają pierwszy kontakt ze składnikami krwi. Dlatego też ten fragment badań uważam za bardzo ważny. Badania wpływu krzemionek na erytrocyty pokazały, że badane krzemionki SBA są nietoksyczne przy stężeniu 200µg/ml natomiast dla stężenia 1000µg/ml obserwowano hemolizę po 2 godz. 50%, 5%, 2,5% i 5% dla krzemionek SBA-NH₂, SBA- OH, SBA-SH, SBA-COOH - odpowiednio. Hemoliza dla krzemionki amorficznej w najniższym stężeniu wynosiła 50%.

Ważnym procesem podczas podawania leków przez nanocząsteczki do organizmu jest oddziaływanie nośników z białkami. Autorka przeprowadziła szereg badań stosując dichroizm kołowy, wygaszanie fluorescencji albuminy oraz wolnego tryptofanu, a także adsorpcji albuminy przez nanocząsteczki. Badany był wpływ albuminy surowicy człowieka (HSA) na hemolizę powodowaną przez nanocząsteczki krzemionkowe. Dodanie albuminy (HSA)

spowodowało znaczne obniżenie hemolizy. Na oddziaływanie krzemionek z albuminą ma wpływ morfologia nanocząsteczek wielkość porów a także grupy funkcyjne.

Dalej autorka bada wychwyty hemoglobiny przez badane krzemionki. Wnikliwe badania pokazały, że ilość zaadsorbowanej hemoglobiny jest funkcją czasu i stężenia krzemionek. Ponadto możliwości wychwyty hemoglobiny przez SBA-COOH są znacznie lepsze w porównaniu z innymi badanymi nanocząsteczkami SBA-SH, SBA-NH₂, SBA-OH. Po upływie 24h absorpcja hemoglobiny przez tę krzemionkę wnosi 90%.

Kolejne badania dotyczą cytotoksyczności krzemionek mezoporowatych oraz krzemionki amorficznej w odniesieniu do komórek prawidłowych B14 - (fibroblasty chomika chińskiego) i nowotworowych HL60, 1301 - (linie ludzkich komórek ostrej białaczki) oraz BRL - (szczurze komórki raka wątroby). Amorficzna krzemionka okazała się najbardziej toksyczna w stosunku do prawidłowej linii komórkowej B14 oraz nowotworowej linii komórkowej 1301 i wynosiła 80% przy stężeniu 1000µg/ml, niższą toksyczność odnotowano dla linii komórkowych HL60 i BRL. W porównaniu z krzemionkami mezoporowatymi krzemionka amorficzna wykazuje się znacznie wyższą cytotoksycznością w odniesieniu do wszystkich linii komórkowych.

Badanie morfologii badanych nanocząsteczek pokazało, że mają one budowę prętową z wysoce uporządkowaną strukturą. Informacje te pozyskano przy pomocy elektronowego mikroskopu transmisyjnego TEM a także mikroskopu sił atomowych ATM. W celu poznania powierzchni nanocząsteczek wykonano pomiary potencjału zeta. Najniższy potencjał zarejestrowano dla krzemionki amorficznej -17,8mV, natomiast najwyższy wnoszący -5,6mV dla SBA-NH₂. Badania polegające na wykreśleniu izoterm adsorpcji/desorpcji azotu pozwoliły oszacować powierzchnię właściwą badanych krzemionek, całkowitą objętość porów oraz ich średnicę. Z badań wynika, że średnica porów SBA-COOH wynosi 6,19nm, podczas gdy dla SBA-OH tylko 2,56nm.

Dokładna analiza badań pokazała, że wpływ na zachowanie się mezoporowatych nanocząsteczek w stosunku do komórek prawidłowych i nowotworowych mają grupy powierzchniowe. Uzyskane wyniki pokazały, że z czterech badanych krzemionek SBA-SH, SBA-NH₂, SBA-OH, SBA-COOH nanocząsteczki SBA-COOH posiadają największy potencjał aplikacyjny.

Podsumowanie i wykaz literatury dotyczącej prezentowanej tematyki zamyka dysertację. (str. 73-84).

Aktywność naukowa pani mgr. Małgorzaty Ferenc zaprezentowana została w rozdziale „Spis publikacji i komunikatów zjazdowych” (str.91-93). Dorobek naukowy Doktorantki to 5 prac opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu światowym, w których jest współautorką, 2 prezentacje ustne, oraz 10 prezentacji w formie plakatów prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

Po lekturze niezwykle interesującej pracy, wyczerpującej w zakresie własności biologicznych badanych krzemionek mezoporowatych pozwolę sobie na komentarz a także kilka pytań.

W swojej pracy badawczej zajmowała się Pani również dendrymerami, które od kilkunastu lat są szeroko badane w celu zastosowania ich w medycynie.

Leki przenoszone przez dendrymery są często powiązane poprzez wiązania wodorowe lub oddziaływania elektrostatyczne co sprawia, że lek jest zbyt szybko uwalniany a jego

efektywność limitowana w czasie. Stosuje się także połączenia wiązaniami atomowymi które z kolei często trudno uwalniają dostarczany przez nie lek w miejscu docelowym. Znane są przykłady dendrymerów fosforowych i krzemowych które mają własności przeciwzapalne lub przeciwnowotworowe. Kolejnym ciekawym zastosowaniem dendrymerów polikationowych jest możliwość tworzenia przez nie dendrypleksów z si-RNA.

Unikalna budowa krzemionki mezoporowatej tworzącej przestrzenną regularną sieć z obecnymi wieloma regularnymi porami a także możliwość jej modyfikowania sprawia, że wydaje się ona być bardziej użyteczna niż cząsteczki dendrymerów jako materiał służący do przenoszenia leków. Ponadto uwalnianie leku na poziomie chorych komórek może być łatwo monitorowane.

Czy krzemionki mezoporowate posiadają aktywność leczniczą bez połączenia z lekami, co ma miejsce dla dendrymerów fosforowych?

Do tej chwili nie jest możliwe użycie krzemionek SBA w diagnostyce klinicznej czy leczeniu ponieważ podanie SBA poprzez iniekcję powoduje stan zapalny w miejscu podania. Czy znane są inne możliwości (drogi) podawania SBA do organizmu np. doustnie, poprzez inhalację itp.?

Czy wiadomo coś na temat stabilności, a również odporności na hydrolizę modyfikowanych krzemionek?

Przy okazji nasuwa się pytanie, czy nie byłoby zasadne do modyfikacji krzemionek mezoporowatych użyć sililowanych fosfonianów, czy kwasów fosfonowych które są bardziej biokompatybilne ?

Mniejszą pojemność absorpcyjną hemoglobiny przez krzemionki SBA-FA-COOH w porównaniu z krzemionkami SBA-COOH tłumaczy Pani mniejszą ilością przyłączonych grup funkcyjnych do powierzchni krzemionki a także hydrofobową naturą łańcuchów kwasu tłuszczowego. Czy nie należałoby także uwzględnić możliwości tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi, a tlenem karbonylowym sąsiadujących z sobą grup karboksylowych, co wydaje się być łatwiejsze w przypadku SBA-FA-COOH?

Z badań hemolizy indukowanej przez badane cząsteczki wynika, że najwyższą hemolizę odnotowała Pani dla krzemionki SBA-NH₂, (80% po 24 h) jakkolwiek nie znalazłam uzasadnienia takiego wyniku. Wiadomo, że polikationowe cząsteczki są toksyczne np. polikationowe dendrymery są znacznie bardziej toksyczne niż polianionowe czy obojętne. Czy zgodzi się Pani, że toksyczność krzemionki SBA-NH₂ wynika z możliwości protonowania grupy NH₂, (utworzenia dodatnio naładowanej grupy amoniowej) podczas inkubacji?

Nie jest także jasne dlaczego krzemionki SBA-SH są mniej toksyczne oraz powodują najniższą hemolizę. Czy może wynika to ze specyfiki grup SH, które mogą tworzyć wiązania dwusiarczkowe co ma miejsce np. w insulynie gdzie grupy SH z cysteiny poprzez tworzenie wiązań dwusiarczkowych (S-S) łączą łańcuchy polipeptydowe?

W rozdziale pt. Dyskusja (str. 66) napisała Pani „*gdy nanocząsteczki są wstrzykiwane do krwi ich powierzchnia szybko przykrywa się warstwą białek licznie obecnych we krwi, taka warstwa*

nazywa się koroną białkową. Dla wielu zastosowań biomedycznych formowanie się takiej białkowej warstwy na powierzchni krzemionek jest niepożądane” Natomiast w streszczeniu czytamy, że w wyniku oddziaływania krzemionek z albuminą na ich powierzchni tworzy się korona białkowa w wyniku czego zyskują one nowe – lepsze właściwości. Czy mogłaby Pani skomentować te informacje?.

Do obowiązku recenzenta należy także ocena jakości maszynopisu przedstawionej dysertacji. Pragnę podkreślić, że została ona przygotowana bardzo starannie. Drobne błędy i pomyłki w żaden sposób nie wpływają na jej czytelność. Niemniej jednak na str. 58 rys. 7 podpisany jest zdjęcia z TEM przedstawiające mezoporowate nanocząsteczki krzemionkowe SBA-NH₂ natomiast na zdjęciu jest napis, że dotyczy ono krzemionki SBA-COOH.

Str.68 rys.11 niejasny jest podpis pod rysunkiem „zależność dostępu do powierzchni nanocząsteczek krzemionkowych od długości łącznika a) SBA-COOH, b) SBA-FA-COOH”- rozumiem że chodzi o cząsteczki hemoglobiny, które na rysunku przedstawione są jako czerwone krążki.

Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów, tzw. literówek i kilku niezbyt poprawnych stylistycznie sformułowań. Nie sądzę, jednak aby było wskazane wymienianie ich w tym miejscu, bowiem nie mają wpływu na moją wysoką ocenę rozprawy.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr Małgorzaty Ferenc pt. „Właściwości biologiczne funkcjonalizowanych krzemionek mezoporowatych typu SBA” spełnia warunki określone w art.13 ust.1 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595, z późniejszymi zmianami). Zwracam się do Rady Wydziału Biologii i Ochrony i Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o jej przyjęcie i dopuszczenie pani mgr Małgorzaty Ferenc do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Maria Zabłocka