



Białystok, 17.11.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Marię Cristinę Nevarez Martinez**

**pt. „Koniugaty nanoprętów złota z Affibody w terapii fototermalnej celowanej na komórki HER2-dodatniego”, przedstawiona w formie monografii, sporządzona w odpowiedzi na pismo przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne dr. hab. Prof. UG Zbigniewa Kaczyńskiego z dnia 5 października 2023 roku.**

Praca doktorska Pani mgr inż. Marii Cristiny Nevarez Martinez została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Inż. Adriany Zaleskiej-Medyńskiej oraz dr Ewy Wieczerek.

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy opracowania nowych układów przeciwnowotworowych, których bazę stanowią modyfikowane przeciwciałami nanopręty złota. Temat podjętych badań jest niezwykle aktualny i ma związek z poszukiwaniami nowych substancji aktywnych oraz zastosowaniem koniugatów organiczno-nieorganicznych do celowanych terapii przeciwnowotworowych. Pomimo wielu prac odnoszących się zarówno samych związków aktywnych jak i połączeń z nanocząstkami problemy związane z ich zastosowaniem w terapiach wymagają ciągłego poszerzania wiedzy na temat właściwości fizykochemicznych, sposobów modyfikacji i odtwarzalności stosowanych metod syntez.

Rozprawa ma formę monografii i podzielona została na kilka części przedstawionych na 148 stronach jednolitego manuskryptu. Autorka przedstawiła założenia i wyniki swoich badań w sposób typowy dla publikacji naukowych z zakresu chemii. Praca zawiera wprowadzenie (30 stron), które stanowi część literaturową, cel i założenia pracy doktorskiej (1 strona), materiały i metody (26 stron), wyniki i dyskusję (44 stron) oraz podsumowanie (2 strony) i plany (2 strony). W skład manuskryptu wchodzi również: „Abstrakt” „Streszczenie” i (2 strony), spis tabel, rysunków i stosowanych skrótów oraz lista osiągnięć naukowych. Pracę kończy spis literatury (24 strony, 215 pozycji) oraz aneksy (3 strony).

W części literaturowej Doktorantka zwięźle wprowadziła i wyjaśniła podstawowe pojęcia i założenia niezbędne do poznania celu podjętych w dalszej części pracy badań. Przedstawiła strukturę receptora HER2 i jego wykorzystanie w terapiach przeciwnowotworowych. Omówiła



przykłady zastosowania nanocząstek biorąc pod uwagę pasywny i aktywny mechanizm ich działania. Bardzo interesujące są zestawienia w tabelach 1 i 2. W pierwszej Doktoranta zawarła dane dotyczące zatwierdzonych leków nowotworowych i ich nośników z podaniem roku, agencji lub kraju zatwierdzającego oraz schorzenia lub/i mechanizm działania. W kolejnej skupiła się na zestawieniu nośników z nanocząstkami złota. Ta część pracy wskazuje na konkretne zastosowania nanonośników w terapiach klinicznych, co podnosi zasadność podejmowania żmudnych badań podstawowych. W kolejnych rozdziałach przedstawione zostały: terapia fototermiczna, w tym z udziałem nanodrutów złota, ich połączeń z Affibody specyficznych w stosunku do białek receptorowych HER2. Autorka zwróciła również uwagę na mechanizmy śmierci komórkowej w tym mechanizmy terapii fototermicznej. Za cenne uważam podsumowanie, tej części pracy, w którym wypunktowane zostały zalety terapii fototermicznej, wady dotychczas stosowanych metod oraz mankamenty i problemy dotyczące otrzymywania nośników, ich modyfikacji i stabilności w roztworach wodnych. Powyższe skłoniło Panią Martinez do poszukiwań nowych układów do terapii celowanej oraz uzasadnia potrzebę optymalizacji metodologii ich przygotowania. Część teoretyczna jest bardzo dobrym wprowadzeniem do dalszej części pracy.

Pani mgr Maria Nevarez Martinez postawiła kilka celów w swojej pracy. Dotyczyły one opracowania odtwarzalnej metody otrzymywania nanoprętów złota i Affibody oraz modyfikacji nanocząstek Au przeciwciałem. Kolejnymi założeniami badawczymi były: weryfikacja zdolności oddziaływania uzyskanego koniugatu z receptorem HER2 oraz poznanie aktywności w stosunku do komórek raka piersi HER2-dodatniego i HER2-ujemnego z zastosowaniem terapii wspomaganą światłem.

W kolejnym rozdziale pracy Doktoranta umieściła informacje na temat materiałów i stosowanych metod instrumentalnych oraz warunków prowadzenia analiz. Badania zostały zapanowane i opisane z dużą starannością ze szczególnym zwróceniem uwagi na procesy optymalizacji warunków wzrostu nanodrutów oraz metod oczyszczania uzyskanego w wyniku syntezy na nośniku stałym przeciwciała.

Część pracy dotyczącą wyników i dyskusji oceniam bardzo wysoko. Metodologia modyfikacji powierzchni nanocząstek jest skomplikowana, ze względu na ilość zmiennych, które należy brać pod uwagę. Nie jest również proste potwierdzenie hipotez badawczych, które wymaga wykorzystania wielu różnych badań fizykochemicznych i biologicznych. Dobrze zaplanowany i uzyskany nanoterapeutyk powinien być stabilny w medium, w którym jest aplikowany. Dodatek surfaktantów wprowadza dodatkowe komplikacje - jest to „balast” mogący mieć wpływ na efektywność



terapeutyczną. Zgadzam się z ogólnymi wnioskami w odniesieniu do zastosowania PEG-yłowanych pochodnych. Długie łańcuchy polimerowe w zależności od rozpuszczalnika, siły jonowej i pH mogą „opłaszczą” lub ulegać „kłębuszkowaniu”, co utrudnia dostęp na powierzchni nanocząstki i wpływa na efektywność dalszych modyfikacji. Wydajność tzw. „szczepienia na” spada wraz z długością łańcucha polimerowego i gęstością upakowania polimeru na powierzchni. Doceniam, że Doktorantka na zakończenie podsumowania pracy przedstawiła propozycje modyfikacji nanoukładów w celu uzyskania lepszych efektów terapeutycznych. Zaproponowana koncepcja umieszczenia przeciwciała Affi na powierzchni nanocząstek, a nie pomiędzy łańcuchami PEG, powinna zdecydowanie zwiększyć możliwości oddziaływania z receptorem HER2.

Z uwagi na to, że rolą recenzenta jest zadawanie trudnych pytań uprzejmie proszę o komentarze w następujących kwestiach:

- *Na aktywność biologiczną ma wpływy nie tylko rodzaj nanocząstek ale również ich kształt i wielkość. Co zadecydowało o wyborze nanoprętów, a nie sferycznych nanocząstek?*

- *Jak obecność pozostałości kationowego surfaktanu, jakim jest CTAB, może lub wpływa na aktywność biologiczną całego układu? Związki kationowe wykazują działanie drażniące i uczulające, a jest to coraz częściej obserwowane również w przypadku poli(glikolu etylenowego) i jego pochodnych.*

- *Badła Pani masę przeciwciała metodą MALDI. Proszę o informację na jakim urządzeniu? Zazwyczaj MALDI daje nam bardzo dokładną i tożsamą odpowiedź w odniesieniu do masy cząsteczkowej zakładanej i uzyskanej. Jest to przecież technika wykorzystywana do identyfikacji białek w nieznanach matrycach. Różnicy 7 u, w porównaniu do masy oczekiwanej, nie można wytłumaczyć fragmentacją lub obecnością dodatkowego jonu np. (z matrycy lub soli - ułatwiających przenoszenie energii i zwieszających lotność dużych cząsteczek). Nie rozumiem również różnicy pomiędzy masą oczyszczonego i nieoczyszczonego białka.*

- *Przeprowadziła Pani badania konwersji energii świetlnej w cieplną, z zastosowaniem wyjściowych, niemodyfikowanych nanocząstek, w dość dużym stężeniu, stwierdzając, że zachodzi ona z dobrą wydajnością. Proszę o komentarz, czy i jeżeli tak to w jaki sposób modyfikacja nanoprętów wpłynie na wydajność konwersji energii? Z jakim stężeniem NP w przypadku badań na komórkach nowotworowych mogła mieć Pani do czynienia (po usunięciu nadmiaru, który nie uległ immobilizacji)? Czy zastosowana została ta sama intensywność światła podczas naświetlania? Czy obserwowana aktywność terapeutyczna miała szansę być wynikiem efektu cieplnego wynikającego ze zjawiska hipertermii?*



*- W literaturze można znaleźć doniesienia na temat jeszcze innego mechanizmu działania terapii fototermicznej, choć wymaga to dodatkowego potwierdzenia. Prawdopodobnym jest, że wyniku aktywowania nanocząstek złota światłem (o odpowiedniej energii), na ich powierzchni wytwarzają się wolne rodniki, które również mogą być odpowiedzialne za śmierć komórki?*

Pragnę zaznaczyć, że przedstawione wyniki są bardzo ciekawe oraz ważne w aspekcie poszukiwania nowych leków i stosowania terapii celowanych do zwalczania nowotworów. W tym agresywnej postaci raka piersi HER2, który szybko się rozwija i częściej daje przerzuty. HER2 to białko receptorowe, które jest zaangażowane w przekazywanie komórkom sygnałów związanych z kontrolą ich wzrostu i funkcjonowania. Zaproponowana przez Doktorantkę metodologia opiera się na koncepcji blokowania agresywnego receptora HER2. Pomimo, iż wyniki badań biologicznych nie były do końca satysfakcjonujące, wyciągnięte zostały prawidłowe wnioski i postawione nowe hipotezy badawcze zwiększające prawdopodobieństwo sukcesu.

Należy podkreślić, że nie tylko nowe układy terapeutyczne są interesujące, lecz z punktu widzenia metodologicznego kluczowe znaczenie ma również doskonalenie metod syntezy oraz optymalizacja procedur i eksperymentalna weryfikacja stawianych hipotez.

Praca pod względem edytorskim została zredagowana dobrze, z dużą uważnością i starannością. Do tekstu rozprawy zakradła się pewna, niewielka, liczba błędów językowych i literowych, których nie będę wymieniać.

Doktorantka ma bardzo dobry dorobek publikacyjny. Jestem przekonana, że wyniki będące przedmiotem rozprawy będą również opublikowane w dobrym czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Pani Martinez wykazuje się aktywnością konferencyjną oraz poznawczą, np. w aspekcie badań biologicznych (staż w Londynie). Na podkreślenie zasługuje również efektywność w pozyskiwaniu funduszy na badania naukowe (3 projekty, w tym Preludium) oraz uczestnictwo w realizacji projektów docenionych i finansowanych przez NCN w ramach konkursu OPUS.

### **Podsumowanie**

Stwierdzam, że Doktorantka prawidłowo ustaliła plan i metodykę zaprezentowanych badań. Jest to bardzo solidna praca wymagająca sprawności oraz ogromnej cierpliwości i staranności eksperymentatorki. Analiza wyników badań wymagała interdyscyplinarnej wiedzy teoretycznej i umiejętności. Doktorantka wykazała się znajomością różnorodnych technik, na podstawie których potrafiła opracować wyniki. Przedstawiona została odpowiednia ilość badań pozwalająca na poznanie metodologii odtwarzalnego otrzymywania i właściwości zmodyfikowanych przeciwciałem HER2



# UNIWERSYTET w BIAŁYMSTOKU

## WYDZIAŁ CHEMII



Prof. dr hab. Agnieszka Z. Wilczewska

15-245 Białystok, ul. Ciołkowskiego 1K, ☎ (85) 7388037, fax: 7388099, e-mail: [agawilcz@uwb.edu.pl](mailto:agawilcz@uwb.edu.pl)

nanocząstek. Wnikliwe analizy fizykochemiczne i biologiczne doprowadziły do wyciągnięcia bardziej szczegółowych wniosków związanych z możliwościami ich zastosowania w leczeniu raka piersi. Interpretacja wyników nie budzi zastrzeżeń merytorycznych. Praca doktorska Pani mgr inż. Marii Cristiny Nevarez Martinez zawiera wymagane w rozprawach doktorskich elementy nowości naukowej.

### Wniosek końcowy

Wyniki uzyskane przez Pani mgr inż. Marię Nevarez Martinez są oryginalne, a rozprawa wnosi istotny wkład w rozwój chemii. Zamieszczone uwagi mają charakter formalny oraz wynikają z zainteresowania wynikami pracy. Nie mają one wpływu na bardzo dobrą ocenę merytoryczną badań przedstawionych w ramach rozprawy. Rozprawę cechuje wysoki poziom naukowy i poznawczy.

**Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca Pani mgr inż. Marii Nevarez Martinez pt. „Koniugaty nanoprętów złota z Affibody w terapii fototermalnej celowanej na komórki HER2-dodatniego”, spełnia wszystkie wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j.: Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.) i zwracam się do wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenia Pani mgr inż. Marii Nevarez Martinez do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

*Agnieszka Wilczewska*