

Recenzja pracy doktorskiej pani Anny Kozińskiej,

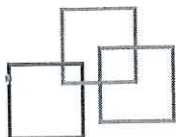
pt. **Fotoreaktywność i efektywność fotodynamiczna nowej generacji fotosensybilizatorów w układach modelowych i komórkowych**

Praca doktorska pani Anny Kozińskiej wykonana na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej oraz na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod kierunkiem prof. dr hab. Wojciecha Gawlika i prof. dr hab. Tadeusza Sarny.

Praca była częściowa realizowana w ramach grantu **Preludium** finansowanego przez NCN

Przedstawiona do recenzji rozprawa składa się z sześciu rozdziałów oraz streszczenia i abstraktu w języku angielskim. Ostatnie rozdziały rozprawy zawierają literaturę związaną z tematyką pracy – 124 pozycje, w tym jedna pozycja z 2012 roku jest pracą, w której Doktorantka jest współautorką. W Suplemencie zebrane zostały widma EPR adduktu spinowego $\text{DMPO}^{\cdot-} \text{N}_3$ (lub $\text{SO}_3^{\cdot-}$) dla wszystkich badanych nanomateriałów w warunkach tlenowych i beztlenowych i dla różnych stężeń wybranych rozpuszczalników.

W streszczeniu Doktorantka przedstawiła materiał, który był przedmiotem jej badań. Materiał zaskakujący, gdyż Autorka postanowiła przebadać związki fotouczulające (fotosensybilizujące): funkcjonalizowane pochodne fulerenu – BB6 i BB11 oraz modyfikowane powierzchniowo ditlenki tytanu – Hmx@TiO_2 i Brp@TiO_2 , które ze względu na swe właściwości mogą znaleźć zastosowanie w terapii fotodynamicznej nowotworów (PDT). Od pewnego czasu pojawia się bardzo dużo prac dotyczących zastosowania nanomateriałów jako potencjalnych leków, w tym w terapii PDT i ten temat podjęty został w niniejszej rozprawie.

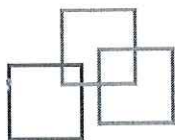


W pierwszym rozdziale pracy – „Wstęp” - omówione zostały podstawy terapii fotodynamicznej, wymagania stawiane dla skutecznego fotosensybilizatora, powstawanie takich produktów w procesie aktywowania uczulaczy jak tlen singletowy, zredukowane reaktywne formy tlenu czy inne wolne rodniki. Przedstawione zostały też możliwe ścieżki niszczenia komórek patologicznych, w tym szczególnie uwaga została zwrócona na peroksydację warstwy lipidowej komórek oraz właściwości ochronne melaniny, gdyż badania *in vitro* wykonano na czerniaku, w którym obecna jest melanina. W końcowej części tego rozdziału podane zostały właściwości i charakterystyka funkcjonalizowanych fulerenów jak i modyfikowanych nanocząstek TiO_2 .

W kolejnym rozdziale „Cele pracy” Doktorantka przedstawiła główne zadania jakie chciałaby rozwiązać w niniejszej pracy: określenie właściwości fotofizycznych i fotochemicznych funkcjonalizowanych fulerenów i modyfikowanych ditlenków tytanu, zbadanie fotoefektywności nanocząstek w utlenianiu lipidów tak w liposomach jak i w komórkach *in vitro*, ustalenie optymalnych warunków procesu PDT dla badanych fotosensybilizatorów oraz analiza wpływu melaniny na przeżywalność badanych w pracy komórek czy określenie tempa peroksydacji lipidów w tychże komórkach.

Rozdział trzeci „Materiały i metody” zawiera opis metod przygotowywania fotosensybilizatorów, preparatyki DOPA - melaniny i liposomów użytych w pracy. Opisane zostały techniki badawcze jakie zastosowała Doktorantka. Spektrofotometr został użyty do pomiarów absorpcji fotosensybilizatorów, do wyznaczenia produktów peroksydacji lipidów czy transmitancji przy pomiarach fotokonsumpcji tlenu, pułapkowania spinowego i indukowania peroksydacji lipidów. Przy pomocy układu rozdzielczo – czasowej detekcji fosforescencji wykonano pomiary generacji tlenu singletowego $^1\text{O}_2$ i czasu jego zaniku. Technika spektroskopii EPR wykonano szereg badań takich jak: wyznaczenie tempa fotokonsumpcji tlenu, pułapkowania spinowego w różnych układach modelowych oraz oznaczono stężenia melaniny w próbkach biologicznych. Inne badania takie jak określenie na przykład mechanizmu peroksydacji lipidów, wyznaczenie rodników wykonano stosując m. in. chromatografię cieczową HPLC - EC(Hg).

Badania *in vitro*, na komórkach melanomy mysiej dotyczące oceny ich przeżywalności czy rodzaju śmierci wykonano standardowymi metodami takimi jak testy MTT.



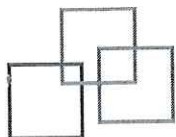
Rozdział 4 „Wyniki” przedstawia uzyskane rezultaty badań właściwości fizykochemicznych zastosowanych fotosensybilizatorów (funkcjonalizowane fulereny i modyfikowane nanocząstki ditlenku tytanu), efektywność generowania przez nich reaktywnych form tlenu, wolnych rodników w obecności tlenu czy w warunkach beztlenowych, w środowiskach takich jak: azydek sodu, rodanek sodu, siarczyn sodu.

W obszernej części „Dyskusja” szczegółowo omówione zostały uzyskane w pracy doktorskiej wyniki, które miały odpowiedzieć czy nowe funkcjonalizowane pochodne fulerenu oraz modyfikowane powierzchniowo ditlenki tytanu wykazują aktywność fotodynamiczną, czy mogą być zastosowane jako potencjalne fotouczulacze w terapii PDT.

Badania *in vitro* przeprowadzono na liniach komórkowych czerniaka mysiego B16, gdyż ta odmiana nowotworu skóry jest wyjątkowo oporna na terapię fotodynamiczną i eksperymenty zaproponowane w niniejszej pracy ukierunkowane były na określenie wpływu melaniny na wydajność fotodynamiczną badanych nanomateriałów.

Określono właściwości fotofizyczne i fotochemiczne badanych nanomateriałów: wykazano, że oprócz fulerenu BB11, pozostałe związki wykazują stosunkowo dużą aktywność fotodynamiczną zależną tak od środowiska, stężenia fotosensybilizatorów jak i od czasu ich naświetlania. Udowodniono, że mechanizmy związane z wytwarzaniem tlenu singletowego czy form wolnorodnikowych zależą od środowiska, w którym się znajdują. I tak w nanocząsteczkach ditlenku tytanu, które są półprzewodnikami, w środowisku donora elektronów (np. NADH – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy) po naświetleniu, ma miejsce przeniesienie elektronu z pasma przewodnictwa na cząsteczki substratów. Funkcjonalizowany fuleren (BB6) jest w stanie utleniać substraty w komórce biologicznej zarówno poprzez wytwarzanie tlenu singletowego jak i wolne rodniki. W zależności od środowiska, w którym znajduje się, dominującym staje się jeden z mechanizmów fotosensybilizowania. W przypadku modyfikowanych nanocząsteczek ditlenku tytanu, proces przenoszenia elektronu i wytwarzanie różnych form wolnorodnikowych jest procesem bardziej wydajnym.

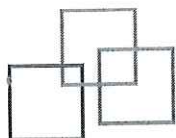
Z badań *in vitro* uzyskano wyniki, które wskazują, że tak fulereny jak i modyfikowane TiO_2 indukują w procesie fotouczulania peroksydację lipidów tak w wielowarstwowych liposomach (POPC:Chl) jak i



w tkankach nowotworowych (linia B16). W przypadku funkcjonalizowanych fulerenów za uszkodzenia błon lipidowych odpowiedzialny jest wygenerowany tlen singletowy (mechanizm typu II), podczas gdy dla modyfikowanych ditlenków tytanu dominującym produktem utleniania cholesterolu jest wodorotlenek cholesterolu ($7\alpha/8$ -OOH), świadczący o wolnorodnikowym mechanizmie uczulania. Badania te jednoznacznie wskazują, że omawiane związki (oprócz BB11) skutecznie niszczą komórki czerniaka B16, użytego w niniejszej pracy.

W ostatniej części pracy, zatytułowanej „Wnioski” podsumowano, że najistotniejszymi wnioskami uzyskanymi w niniejszej pracy to:

1. Funkcjonalizowane fulereny wykazują wysoką efektywność generowania tlenu singletowego i wolnych rodników, przy czym lepszym fotosensybilizatorem okazał się BB6.
2. Wolne rodniki N_3^* i SO_3^{*-} generowane przez aktywowany fuleren BB6 oraz modyfikowane nanocząstki TiO_2 obserwowane są tylko w środowisku azydku sodu i siarczynu sodu
3. W przypadku modyfikowanych nanocząstek ditlenku tytanu, badanych w niniejszej pracy, wykazano ich wysoką efektywność generowania wolnych rodników, podczas gdy wytwarzanie tlenu singletowego w warunkach omówionych powyżej jest znikome.
4. Podobnie jak w ocenie wysokiej wydajności generowania tlenu singletowego i wolnych rodników, funkcjonalizowany fuleren BB6 wykazuje lepsze efekty peroksydacji lipidów dla liposomów POPC:Chl. Stwierdzono, że głównym mechanizmem odpowiedzialnym za peroksydację lipidów jest oddziaływanie z wygenerowanym tlenem singletowym.
5. Określono wpływ melaniny na własności fotosensybilizujące badanych związków, pod kątem ich zastosowania w badaniach *in vitro* na komórkach czerniaka.
6. Badania *in vitro* przeprowadzone na liniach komórkowych czerniaka mysiego B16 wykazały, że oprócz fulerenu BB11, pozostałe związki wykazują stosunkowo dużą aktywność fotodynamiczną zależną tak od stężenia fotouczulaczy jak i od czasu ich naświetlania.



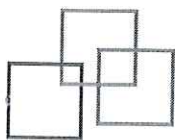
7. *Te ostatnie wyniki rokują pewną nadzieję na zastosowanie badanych w pracy modyfikowanych nanocząsteczek fulerenu i ditlenku tytanu w niszczeniu komórek czerniaka, nowotworu opornego na terapię PDT.*

Przedstawiona do recenzji praca doktorska zawiera cenne dane eksperymentalne, które mają na celu potwierdzenie przydatności badanych modyfikowanych fulerenów i nanocząstek ditlenku tytanu w terapii fotodynamicznej. Jest przykładem pracy interdyscyplinarnej, w której przy pomocy fizycznych metod badawczych i znajomości procesów fotofizycznych opisano możliwe ścieżki reakcji fotochemicznych w komórkach, prowadząc ostatecznie do ich programowanej śmierci. Doktorantka bardzo wnikliwie przebadła i opisała możliwe mechanizmy

Praca napisana jest bardzo przejrzystie, dobrym, profesjonalnym językiem. Zauważyłam jedynie drobne literówki, które w żaden sposób nie umniejszają jej wartości. Doktorantka biegle porusza się po „obszarach fizyki”, wówczas kiedy opisuje podstawy fizyczne zjawisk dotyczących spektroskopii UV-VIS, fotolizy błyskowej, spektroskopii EPR, jak i po „obszarach chemii”, gdy omawia procesy chemiczne zachodzące w układach biologicznych. Wykonała bardzo rzetelnie pomiary dla czterech, zaproponowanych związków, fotosensibilizatorów, stosując różne rozpuszczalniki od których zależało powstawanie produktów fotochemicznych. Sporo miejsca poświęciła dyskusji uzyskanych wyników, dochodząc do wniosków, które na tym etapie eliminują lub wskazują najlepsze kombinacje związku i rozpuszczalnika, co ma istotne znaczenie, przy ich wyborze do badań in vitro.

Podsumowanie:

Podjęty przez panią Annę Kozińską temat, jak i sposób prezentacji oraz omówienie wyników mają wysoką wartość merytoryczną. Sposób przedstawienia wyników badań, umiejętna ich interpretacja świadczą o dobrym opanowaniu teorii z zakresu zjawisk fotofizycznych, fotochemicznych i ich przełożeniu do terapii fotodynamicznej. Uzyskane przez Autorkę rozprawy wyniki mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmu odpowiedzialnego za PDT.



Konkluzja:

*Recenzowana rozprawa doktorska pani Anny Kozińskiej, z tak podjętą tematyką jak i sposobem prezentacji uzyskanych wyników i ich interpretacją spełnia wszelkie wymagania stawiane tego typu pracom. Doktorantka pokazała, że posiada odpowiednią wiedzę i bardzo dobrze opanowany warsztat badawczy. Dlatego z pełnym przeświadczeniem stwierdzam, że rozprawa spełnia warunki stawiane pracom doktorskim określone w art.13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r, nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję o dopuszczenie pani mgr Annę Kozińską do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie **wnioskuję o jej wyróżnienie**, z uwagi na wysoki poziom recenzowanej rozprawy, wysoką wartość naukową i istotny wkład uzyskanych wyników w rozwój terapii fotodynamicznej.*