

Gdańsk, 01.02.2023

Ocena rozprawy doktorskiej:

mgr Ewelina Wałęka-Bargiel

**pt. „Wykorzystanie mikro-/nanożeli
czułych na warunki środowiskowe jako nośniki leków”**

Wstęp

Praca będąca przedmiotem recenzji podejmuje problem bardzo trudnych terapeutycznie chorób nowotworowych proponując kolejny element nowego podejścia do tego zagadnienia poprzez zastosowanie nowych, selektywnych nośników leków. Atrakcyjność wprowadzenia do chemoterapii dodatkowego elementu w postaci środka transportującego, który w sposób kontrolowany będzie uwalniał lek, a następnie poprawiał proces jego wchłaniania wynika z możliwości ograniczenia w ten sposób efektów ubocznych i podwyższenia efektywności terapeutyku, przy tych samych stosowanych dawkach. Systemy kontrolowanego dostarczania leku, DDS, do miejsca jego działania umożliwiają proces projektowania tego procesu w kilku etapach: synteza i załadowanie nośnika, podanie do krwiobiegu kompleksu lek-nośnik oraz kluczowy, modelujący uwalnianie substancji terapeutycznej. Ostatnio, jako atrakcyjny system takiego kontrolowanego uwalniania leku znalazło zastosowanie nano- i mikrocząstek i praca doktorska Pani Eweliny Wałęka-Bargiel wpisuje się w ten kierunek. Doktorantka poza analizą procesów zachodzących z udziałem nano- i mikrożeli, zaproponowała dla selektywnego transportu leków do miejsca działania zastosowanie mikrokapsulek, a także nie ominęła procesu uwalniania leków przez zaprojektowany mikrosystem.

Uwzględniając powyższe fakty, jako cel pracy Autorka przedstawiła syntezę i charakterystykę nano- i mikrożeli otrzymanych na bazie poli(N-izopropylakryloamidu (pNIPA) i poliwinylpirolidonu (pVP) oraz syntezę i opis właściwości mikrokapsulek opartych na NIPA i pVP. W zakresie pracy ujęto też proces kontrolowanego uwalniania badanych leków Doksorubicyny i Epirubicyny w aspekcie cytotoksyczności w stosunku do komórek nowotworowych przy dobrej ochronie komórek zdrowych. W końcowych etapach realizacji każdego z przedstawionych celów przeprowadzono analizę skuteczności wnikania do komórek nowotworowych i zmian cytotoksyczności tych związków w zależności od sposobu podania czyli transportu do komórki nowotworowej.

Praca zrealizowana została w Politechnice Warszawskiej pod kierunkiem współpromotorów Pana Profesora dr hab. inż. Artura Dybko z Politechniki Warszawskiej oraz Pana Doktora hab. Marcina Karbarza z Uniwersytetu Warszawskiego. Zespół Promotorów od szeregu lat zajmuje się zastosowaniem mikro- i nanostruktur w biotechnologii medycznej, chociaż w różnych aspektach.

Prof. Artur Dybko kieruje na Wydziale Chemicznym PW zespołem, który m.in. projektuje i konstruuje miniaturowe sensory i układy diagnostyczne, co jest elementem badań Doktorantki. Doktor hab. Marcin Karbarz jako kierownik Centrum Badawczego Biologii i Chemii Wydziału Chemii UW, jest zaangażowany między innymi w projektowanie, syntezę oraz charakterystykę środowiskowo czułych „inteligentnych” materiałów polimerowych.

Charakterystyka pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa zawiera 205 stron, w tym 19 z nich to odnośniki literaturowe zawierające 243 pozycje. Tekst pracy podzielony jest na 16 rozdziałów, przy czym pierwszy z nich to wstęp z celem pracy, a pozostałe stanowią dwie części: „Część literaturową” od rozdziału 2 do 5 oraz „Część eksperymentalną” od rozdziału 6. Przy czym opis wyników wraz z *Podsumowaniem* kończy się na rozdziale 12, a pozostałe to: 13. *Wykaz skrótów*, 14. *Bibliografia*, 15. *Dorobek naukowy* i 16. *Podziękowania*.

Część teoretyczna, stanowiąca przegląd aktualnej literatury związanej z tematyką rozprawy jest dość obszerna, obejmuje ponad 60 stron. Zawiera z jednej strony krótki opis właściwości, badanych jako modelowe, leków przeciwnowotworowych, Doksorubicyny i Epirubicyny, z drugiej strony wprowadza czytelnika w świat inteligentnych nano- i mikrożeli, będących potencjalnymi systemami kontrolowanego uwalniania leków. W tym zakresie Autorka bardziej szczegółowo przybliżyła właściwości poli(N-izopropylakrylamidu), pNIPA, i poliwinylpirolidonu, pVP, nie unikając doniesień o pewnych ograniczeniach potencjalnych możliwości ich stosowania. W części literaturowej znalazły się też zagadnienia związane z możliwością i technologiami wytwarzania układów mikroprzepływowych, które można zastosować do rejestracji profili uwalniania leków z nanocząstek. Cała *Część teoretyczna*, oparta na około 200 odnośnikach do prac oryginalnych, ilustrowana dziewięcioma Rysunkami, z danymi podsumowanymi w czterech Tabelach napisana jest wyczerpująco, wprowadzając czytelnika w świat inteligentnych nośników leków. Szczególnie wysoko oceniam rozdział 3, gdzie zostały scharakteryzowane właściwości pNIPA, a szczególnie atrakcyjne cechy pVP. Z jednej strony pVP może różnie dostarczać leki, jako składnik kopolimeru czy powłoka lub materiał bazowy, z drugiej strony może wywoływać aktywność typu redukcji toksyczności leków, poprawę ich biodostępności czy lepsze tworzenie biofilmu. Zakładam, że brak odnośników literaturowych w podpisach pod Rysunkami 1-5 oraz 7 i 9 wskazuje, że są oryginalnymi prezentacjami Doktorantki.

Druga część pracy nazwana *Częścią eksperymentalną* ma układ nietypowy, przyporządkowano jej 11 rozdziałów od 6 do 16, przy czym brakuje tam wydzielonego rozdziału poświęconego DYSKUSJI wniosków. Rozdział 6 *Spis odczynników i aparatury* i *Protokoły dotyczące hodowli komórkowej*, rozdział 7, znalazły się jako równorzędne z kilkuetapowym opisem zastosowanych metod i otrzymanych na ich bazie wyników, w rozdziałach 8, 9, 10 i 11. Poza tym elementy dyskusji wyników zostały zebrane w podrozdziale 12 pt. *Podsumowanie pracy i wnioski*, chociaż jest tam (zgodnie z tytułem) głównie podsumowanie wyników własnych. Muszę jednak przyznać, że pomimo nietypowego układu, sposób przedstawienia wyników w rozdziałach 8-11 czyni je dobrze czytelnymi, a przedstawiony układ pracy został prawdopodobnie dostosowany do jej charakteru, gdzie każde z czterech „podejść” i otrzymane wyniki stanowiły integralną jej część.

Otrzymane wyniki

Rozdział 8, pt. *Nanożel poli(NIPA 82% BISS 2% AANA 10%)* oraz rozdział 10, pt. „*Mikrożel P(VP 82%- AA 16%- BAC 2%)*” to główne części pracy prezentujące jej wyniki z zakresu nano- i mikrożeli. Syntezę nanożeli pNIPA przeprowadzono metodą strąceniową semi-batch, co dobrze ilustruje Rysunek 10 wraz z przedstawieniem chemicznych struktur reagentów, jak i syntetyzowanego nanożelu. Dla oczyszczonych dializatów określono stężenie otrzymanego produktu oraz scharakteryzowano go za pomocą widm NMR i FT-IR. Po wstępnej charakterystyce strukturalnej opisano dalsze właściwości otrzymanych nanożeli, takie jak masa cząsteczkowa i średnica hydrodynamiczna oraz stabilność i podatność na degradację z udziałem glutationu. Metoda statystycznego rozpraszania światła (SLS) zastosowana dla oceny masy cząsteczkowej nanożelu, dała wynik ok. 2000 kDa przed degradacją i ok. 100 kDa po degradacji, natomiast miareczkowanie próbek dało ilość grup karboksylowych 0.44 $\mu\text{mol}/\text{mg}$. Poznana charakterystyka właściwości pozwoliła dalej zbadać przydatność nanożeli jako nośników leków, w tym przypadku Dox. Tak zwana ładowność leku, DLC, wydaje się być wysoka w porównaniu z podaną w literaturze. W tym miejscu pytanie do Doktorantki, czy „pokazana w literaturze” wartość DLC dotyczyła takich samych nośników? Profile uwalniania zostały szeroko zbadane w różnych warunkach pH i w obecności GSH. Ostatni etap badań pNIPA to obserwacja ich losów w komórkach nowotworowych w porównaniu ze zdrowymi. Jest to bardzo ważny etap badań Doktorantki, ponieważ daje możliwość porównania założeń pracy do warunków w żywym organizmie. Szczególnie, że uwzględniony został fakt potencjalnej możliwości selektywnego transportu nośnika leku pomiędzy komórkami nowotworowymi i prawidłowymi. Wyniki wskazały bowiem, że w komórkach nowotworowych lek gromadził się głównie w jądrach, a w prawidłowych wyższe stężenie DOX było w cytoplazmie. Profil cytotoksyczności DOX w zależności od jej obecności w nanożelu pNIPA też wskazywał na selektywność. W komórkach prawidłowych, MCF-10A, Dox w nanożelu była mniej cytotoksyczna od wolnej DOX, chociaż w komórkach nowotworowych, MCF-7, cytotoksyczności te były porównywalne. Nie trzeba dodawać, że ostatnie przytoczone wyniki stawiają zsyntetyzowany w ramach pracy nośnik *poli(NIPA 82% BISS 2% AANA 10%)* jako atrakcyjny transporter leku w terapii przeciwnowotworowej.

Syntezę drugiego z badanych przez Doktorantkę nośników, mikrożelu pVP, przeprowadzono po pierwszych nieudanych próbach, m.in. po zmianie jednego z substratów BISS na BAC i inicjatora z APS na AIBN. Ze względu na zastosowany rozpuszczalnik (acetonitryl) produkt oczyszczano poprzez trójkratne wirowanie. Dalej, podobnie jak w przypadku nanożelu pNIPA, określono stężenie produktu agregacji: 1.00 mg/ml i rozmiar mikrożelu (średnica hydrodynamiczna 220 nm) oraz potwierdzono jego skład widmami ^1H NMR oraz FT-IR. Analiza SEM TEM wskazała, że otrzymano materiał o bardzo niskiej polidispersji. Określono też w zależności od pH zmiany średnicy hydrodynamicznej oraz potencjału Zeta, jak i ilość grup karboksylowych w sieci polimerowej mikrożeli: 3.5 $\mu\text{mol}/\text{mg}$. Dalsze badania właściwości były analogiczne jak dla nanożelu pNIPA, chociaż szersze: degradacja w obecności GSH oraz profile uwalniania DOX i EPI z mikrożeli w nieobecności i obecności GSH, a dalej badania w kierunku zmiany żywotności komórek zdrowych i nowotworowych pod wpływem wolnych leków DOX i EPI oraz załadowanych do mikrożelu pVP. Podobnie jak w przypadku nanożelu pNIPA, w komórkach zdrowych mikrożel pVP załadowany lekiem wykazywał bardzo słabą cytotoksyczność w porównaniu z wolną DOX i EPI. Natomiast parametry żywotności komórek wobec DOX i EPI w stanie

wolnym i w formie załadowanej do nanożelu różniły się tylko nieznacznie. Wyjątek stanowiło działanie DOX wobec komórek nowotworowych A2740, gdzie żywotność komórek była istotnie wyższa po traktowaniu wolną DOX niż załadowaną do mikrożelu. Obserwacje komórek pod mikroskopem konfokalnym ponownie wskazały na koncentrację leków w jądrach komórek nowotworowych, ale w cytoplazmie komórek zdrowych. W przypadku mikrożeli pVP zaobserwowano również ich skuteczne i selektywne wnikanie do komórek nowotworowych stosując technikę cytometrii przepływowej. Była to skuteczność ponad 80% dla linii komórek nowotworowych, a tylko około 10% dla komórek zdrowych.

W ramach szerokiego profilu badań, jaki prezentuje niniejsza praca, Doktorantka podeszła do problemu selektywnego wprowadzania leków przeciwnowotworowych również od strony zastosowania innej formy transportera: mikrokapsulek, tworzących polimerową otoczkę zawierającą w środku rdzeń wodny. Zsyntetyzowane zostały krzemionkowe rdzenie oraz dwa typy kapsulek opartych na pNIPA i pVP. Dalej mikrokapsułki scharakteryzowano w sposób podobny do opisanych wcześniej procedur analizujących właściwości nanożelu pNIPA i mikrożelu pVP uwzględniając analizy właściwości fizykochemicznych jak i aktywność załadowanych do mikrokapsulek DOX i EPI wobec komórek zdrowych i nowotworowych. Uzyskano według tej procedury wysoki procent załadowania chemoterapeutyków oraz najwyższy procent uwolnienia leków w pH 5,2 + GSH, czyli w warunkach komórek nowotworowych. Najlepszy profil terapeutyczny wykazały mikrokapsułki p(VP-82%-AA-16%-BAC-2%). Wykazały one największą zdolność do akumulacji leków przy selektywności wobec komórek nowotworowych

Powyższe trzy części pracy, cz. 8, 10 i 11 to najważniejszy jej element, nasuwa się w tym miejscu pytanie, dlaczego dwie części, 8 i 10, przedzielone zostały rozdziałem poświęconym projektowi nowego mikrosystemu dla uwalniania leków w warunkach pozakomórkowych. Fakt, że zastosowano ten mikroukład do uwalniania leku z mikrożelu pVP nie tłumaczy takiego „przedzielenia” dwóch części pracy. Opisałabym ten nowy mikroukład na początku, przed opisem wyników badań dla trzech badanych sposobów transportu leków: nanożeli pNIPA, mikrożeli pVP oraz mikrokapsulek. Jednak nie można pominąć, że zaprojektowane w pracy mikrostruktury, rozdział 9, to nowy oryginalny układ dla rejestracji uwalniania leków z nano- i mikrocząstek w różnych punktach czasowych. Eksperyment przebiega z zastosowaniem standardowej płytki 96-dołkowej i pozwala na rejestrację profili uwalniania w czasie rzeczywistym. Mikrosystem ten został opatentowany, gdzie pierwszym autorem jest Pani Wałęka-Bargiel. NrP.438905/09.09.2022 oraz nagrodzony złotym medalem na Międzynarodowej Warszawskiej Wystawie Wynalazków IWIS 2022.

Podsumowanie pracy i wnioski.

Jak wspomniałam powyżej bardzo dobrze przedstawione badania konsekwentnie zmierzające do realizacji Celu pracy nie zostały dostatecznie przedyskutowane. Brak rozdziału *Dyskusja wyników* jest w pracy prawdopodobnie konsekwencją wcześniej analizowanych i krótko dyskutowanych wyników cząstkowych w kolejnych rozdziałach opisanych powyżej jako Wyniki. Natomiast w ostatnim rozdziale pracy pt. „Podsumowanie pracy i wnioski”, którego tytuł jest adekwatny do zawartości, Autorka prezentuje zestaw wyników i wniosków, które przedstawiła wcześniej, jako podsumowanie kolejnych etapów badań. Otrzymane wyniki bardzo dobrze zebrały dwie Tabele 8 i 9 porównujące

otrzymane materiały ze względu na charakterystyczne dla nich parametry fizykochemiczne, jak i wyniki badań cytotoxycywności i specyficzności wnikania do komórek nowotworowych i zdrowych. Element dyskusji w tej części pracy, str.179, dotyczył przyczyn, dla których procent załadowania DOX i EPI był wyższy w przypadku mikrokapsulek w porównaniu do nano-/mikrożeli, chociaż te ostatnie zawierały więcej grup karboksylowych. Charakter dyskusji mają też przedstawione przez Autorkę przyczyny, dla których podjęła się opracowania mikrosystemu przepływowego dla rejestrowania profili uwalniania leków w wielu próbkach jednocześnie. Zakończenie *Podsumowania* jest bardzo klarownie napisane, obejmuje też ewentualne plany przyszłych badań.

Edycja pracy

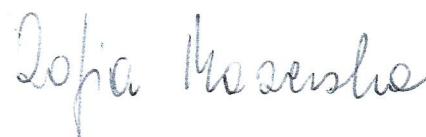
W niniejszej pracy w sposób bardzo staranny opisane zostały wyniki, a edycja pracy nie budzi wątpliwości. Tytuł pracy jest krótki i został trafnie sformułowany, chociaż zamieniłabym wyraz „wykorzystanie” na „zastosowanie” lub na inny. Tekst pracy jest dobrze wspomagany starannie przygotowanymi rysunkami i tabelami.

Chciałabym też podkreślić, że Autorka popełniła bardzo mało pomyłek edytorskich typu braku liter czy pomyłki w tekście. Z obowiązku recenzenta zaproponowałabym jednak zamianę często spotykanych w pracy wyrazów (również w tytule pracy) „wykorzystanie, użycie” na „stosowanie, zastosowanie”, natomiast „dobieranie” (str. 105) na „wybór”. Z pomyłek zamieniłabym na str. 98 podrozdział 8.2.6 na 8.1.7.

Wnioski końcowe

Podsumowując, recenzowana praca doktorska prezentuje bardzo wysoki poziom przeprowadzonych badań i szeroki ich zakres oraz bardzo staranny i czytelny opis otrzymanych wyników.

Stwierdzam, że rozprawa Pani Eweliny Wałęki-Bargiel pt. „Wykorzystanie mikro-/nanożeli czułych na warunki środowiskowe jako nośniki leków.” spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym i przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne wniosek o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Wałęki-Bargiel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Wniosek o wyróżnienie

Jednocześnie rekomenduję wyróżnienie pracy doktorskiej Pani Eweliny Wałęki-Bargiel pt. „Wykorzystanie mikro-/nanożeli czułych na warunki środowiskowe jako nośniki leków”. W mojej opinii, praca zasługuje na wyróżnienie, ponieważ:

1. Podjęła nową, aktualną i prężnie się rozwijającą tematykę nowych form leków podwyższających istotnie ich selektywność wnikania do komórek nowotworowych.
2. Po raz pierwszy scharakteryzowała szeroko nowe polimery z trzech grup strukturalnych: nanożeli, mikrożeli i mikrokapsulek w aspekcie ich zdolności selektywnego podwyższenia aktywności przeciwnowotworowej znanych leków DOX i EPI przy niskiej toksyczności wobec komórek prawidłowych.

3. Jeden z elementów pracy został opatentowany, Nr P.438905/09.09.2022 oraz nagrodzony złotym medalem na Międzynarodowej Warszawskiej Wystawie Wynalazków IWIS 2022.
4. Praca jest bardzo dobrze napisana. Z jednej strony czytelnik znajduje w danym elemencie tekstu wszystkie ważne informacje, z drugiej strony są one przedstawione w sposób łatwy do odbioru i zapamiętania.
5. Tekst pracy wsparty jest dużym zestawem odnośników literaturowych, 243, zdecydowana większość z nich, 178, ukazało się po roku 2010, a 64 są z lat 2020-2022.

Zofia Maselska