



**UNIwersYTET MEDYCZNY**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wrocław 07.02.2023

Dr hab. inż. Julita Kulbacka, prof. UMW  
Katedra i Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej  
Wydział Farmaceutyczny  
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich  
ul. Borowska 211A, 50-556 Wrocław  
e-mail: julita.kulbacka@umw.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Wałęka-Bargieł**

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

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Eweliny Wałęka-Bargieł została wykonana w Katedrze Biotechnologii Medycznej Wydziału Chemicznego, Politechniki Warszawskiej, pod kierunkiem i opieką merytoryczną prof. dr hab. inż. Artura Dybko oraz dr hab. Marcina Karbarza.

Tematyka rozprawy doktorskiej skupia się na opracowaniu nowych materiałów hydrożelowych, oraz ich walidacji pod kątem dostarczania leków przeciwnowotworowych i potęgowania ich cytotoksycznego efektu. Doktorantka podjęła się realizacji ważnych i niezwykle aktualnych zagadnień, które mogą przyczynić się do lepszej biodystrybucji leków, nie tylko w chorobach nowotworowych. Zastosowanie nośników mikro- i nanożelowych do kontrolowanego transportu i lokalnego uwalniania cząsteczek leku wydaje się niezwykle ciekawym rozwiązaniem, które nie wymaga modyfikacji substancji leczniczej i może pozwolić na zmniejszenie aktywnej dawki leku. Obecnie ciągle poszukuje się nowych, skutecznych i bezpiecznych metod dostarczania leków do docelowego miejsca działania, co jest jednym z wyzwań nowoczesnej farmacji i medycyny. Dysertacja Pani mgr Eweliny Wałęka-Bargieł doskonale wpisuje się w nurt tych badań.

Rozprawę pani mgr Eweliny Wałęka-Bargieł rozpoczyna streszczenie w języku polskim i angielskim, w zwięzły sposób podsumowujące zagadnienia podejmowane w dysertacji. Praca ma dość klasyczny układ obejmujący cel pracy, część literaturową, eksperymentalną oraz

podsumowanie i wnioski. Autorka rozpoczyna cel pracy od dość ogólnego i odważnego stwierdzenia wskazującego, że ograniczenie palenia papierosów przyczyniło się do zmniejszenia wskaźników zgonów powodowanych przez choroby nowotworowe. Niestety nie mogę się z tym zgodzić, takie stwierdzenie nie jest dość precyzyjne. Poza tym trzeba mieć na uwadze rosnącą popularność papierosów elektronicznych, które poza nikotyną zawierają o wiele więcej toksyn niż tzw. „tradycyjne” papierosy, w tym nitrozaminy, aldehydy oraz lotne związki organiczne. Początkowe cztery paragrafy tego rozdziału, nie do końca są związane z tematyką rozprawy, można je przeredagować i znacząco skrócić. Praca ma na celu rozwiązanie słabej biodystrybucji leków i nie podejmuje analizy biologicznej i mikrośrodowiska nowotworów piersi i jajnika.

Mając na uwadze szeroki zakres przeprowadzonych badań i mnogość uzyskanych wyników, w rozprawie powinien znaleźć się również rozdział „Dyskusja”, który odnosiłby otrzymane rezultaty do aktualnego stanu wiedzy. Uzupełniającym i ważnym dodatkiem, wskazującym na aktywność naukową Doktorantki jest wykaz publikacji, nagród, patentów oraz aktywności konferencyjne, zarówno w reprezentowanej tematyce jak i poza tematyką podejmowaną w ramach badań własnych.

Tematyka rozprawy jest wielowątkowa, obejmuje nie tylko kontrolowane systemy do dostarczania leków, ale również systemy mikroprzepływowe. W związku z tym Doktorantka w „Części literaturowej” zapoznaje czytelnika czym są hydrożele, jaka jest metodyka ich otrzymywania a także jaka jest rola i ograniczenia poli(winylopirolidonu) i poli(N-izopropylakryloamidu) – materiałów używanych w badaniach własnych. Ta część jest bardzo obszerna i częściowo mogła by zostać umieszczona w brakującej części „Dyskusja”. Autorka w formie tabeli wskazuje też jakie leki zawierają pVP, jednak nie podaje źródła pochodzenia tych danych. Podobna uwaga dotyczy Rycin 1-5, tu również nie pojawiło się źródło literaturowe. Natomiast w przypadku Rys. 6 pokazano schemat struktury core-shell nanocząstek zaczerpnięty z prac naukowych, z odpowiednim cytowaniem. Czy Doktorantka otrzymała zgodę autorów na potrzeby umieszczenia schematu w swojej rozprawie?

W dalszych fragmentach, Autorka opisuje wybrane do badań modelowe leki przeciwnowotworowe: doksorubicynę i epirubicynę, wskazując ich zastosowanie i skutki uboczne. W pracy wskazano, że są to leki wprowadzone do leczenia w latach 70-tych, zatem ich mechanizm działania jest dość dobrze poznany, podobnie jak i indukowane efekty uboczne. W kontekście samej rozprawy warto wspomnieć o mechanizmach oporności lekowej jakie te leki wywołują, dlatego tematyka podejmowana w dysertacji w celu poprawy efektywnego transportu leków jest niezwykle istotna.

Kolejno Doktorantka opisuje systemy mikroprzepływowe, materiały z jakich są wykonywane oraz jakie technologie wykorzystuje się to produkcji tej technologii. Ciekawym aspektem wydaje się zastosowanie takich mikroukładów do analizy uwalniania leków z nanocząsteczek co Autorka rozprawy sprawdziła w swoich badaniach.

W dalszych etapach praca zawiera spis odczynników i aparatury, otwierający część eksperymentalną. Doktorantka przedstawiła tą część raczej niestandardowo, połączyła opis metod z wynikami, dokonując podziału w zależności od rodzaju nośnika. Respektując taki podział, zakładam że ma on na celu ułatwienie analizy prowadzonych badań i otrzymanych wyników. W celu analizy efektywności leku dostarczanego w żelu i w nośnikach wykorzystano test żywotności MTT, cytometrię przepływową oraz mikroskopię fluorescencyjną w celu oceny wychwytu leku. Badania prowadzono na hodowlach komórkowych linii A2780, MCF-7, MCF-10A oraz HOF, stąd Doktorantka podaje skład medium hodowlanego. W tym miejscu zabrakło podania składu medium dla komórek HOF. Warto też w odniesieniu do wykorzystywanych materiałów laboratoryjnych używać słownictwa „niekolokwialnego”, np. zamiast „falkony” i „epedorfy”, raczej próbki wirówkowe o określonej objętości i tu podać objętość używanych próbek.

Autorka w dalszej części podaje protokół pasażowania komórek z zastosowaniem roztworu trypsyny lub TrypleExpress. Tu pojawiło się dość nieprecyzyjne określenie, że są to „substancje”, raczej powinno się napisać, że jest to roztwór enzymu pochodzenia zwierzęcego, w przypadku Tryple rekombinowanego, stosowanym do dysocjacji adherentnych (przylegających) komórek ssących.

W dalszej części rozdziału opisano syntezę i analizę nanożeli. W opisie metodyki Autorka czasem pisze pełną nazwę substancji chemicznych np. chlorek sodu, a czasem wzór sumaryczny HCl, NaOH, warto to ujednotwić. W rozdziale 8.1.3. podano dość ogólną procedurę określania stabilności nanożeli, a mianowicie, cytując:

*„Roztwory przygotowano przez zmieszanie roztworu nanożelu z odpowiednią ilością roztworu HCl (0.3M), NaOH (0.3M) lub chlorku sodu (0.3M)”, co w tej procedurze oznacza „odpowiednia ilość?”*

W rozdziale 8.1.8 Autorka opisuje metodykę analizy przy pomocy mikroskopii konfokalnej. W metodzie wykorzystano szalki 4-komorowe, na które wysiewano komórki. Nie do końca wiadomo jakie szalki wykorzystano oraz jaką ilość komórek wysiewano, co jest istotne w przypadku zachowania powtarzalności badań. Zabrakło też szczegółów obrazowania tj. długości fali wzbudzenia i emisji dla poszczególnych znaczników komórkowych.

Rozdział 8.1.9 dotyczy oceny cytotoksyczności testem MTT. W początkowym opisie wskazano, że badania prowadzono na komórkach MCF-7, MCF-10A oraz dodatkowo na

komórkach raka jajnika A2780, aby potwierdzić wpływ nanocząstki z lekiem. Co oznacza w tym badaniu dodatkowe zastosowanie tej linii komórkowej w odniesieniu do komórek MCF? W rozdziale tym zabrakło podania procedury pomiaru. Po rozpuszczeniu kryształów formazanu, Autorka przechodzi od razu do wyników.

W rozdziale 9, Doktorantka opisuje technologię wytworzenia mikroukładu, którego celem jest walidacja uwalniania leków w warunkach pozakomórkowych. Badania wskazują, że wykonany mikroukład jest dość stabilny i może być wykorzystywany do analizy uwalniania substancji wykazujących właściwości fluorescencyjne. Na uwagę zasługuje fakt, że opracowana przez Doktorantkę konstrukcja jest przedmiotem zgłoszenia patentowego. Nasuwa się pytanie czy opracowany mikroukład nadawałby się również do analiz leków enkapsulowanych w nośnikach innego typu? Czy można stwierdzić że jest to rozwiązanie uniwersalne?

Autorka podjęła się ambitnej próby rozwiązania problemu słabej biodystrybucji doksorubicyny i epirubicyny. W tym celu sięgnęła po kilka rozwiązań poprzez syntezę nano- i mikrożeli oraz konstrukcję tzw. układu Lab-on-Chip. Uzyskane w ramach realizacji rozprawy wyniki ukazują, że zastosowane nośniki poprawiają cytotoksyczność DOX i EPI, o czym świadczy wyznaczony indeks cytotoksyczności. Doktorantka jednocześnie wykazała, niższą toksyczność badanych układów wobec komórek prawidłowych, co również potwierdza selektywność syntezowanych nośników. Najlepszym i wysoce selektywnym układem okazał się mikrożel i kapsułki przygotowane w oparciu o pVP.

Z pozycji recenzenta oceniałam, czy Kandydatka do stopnia doktora wykazuje wiedzę w zakresie reprezentowanej dyscypliny oraz czy posiada umiejętności samodzielnego projektowania i prowadzenia pracy naukowej, oraz analizy otrzymanych wyników. Rozprawa doktorska, jest napisana językiem naukowym i zaopatrzona w schematy ułatwiające czytającemu analizę podjętej tematyki. Doktorantka umiejętnie analizuje otrzymane wyniki i potrafi je odnieść do aktualnego stanu wiedzy. Z obowiązku recenzenta, zwracam również uwagę na pewne niejasności, które znalazłam w tekście pracy:

- opis metodologii wymaga drobnych uzupełnień co zaznaczono w recenzji;
- w tekście napotyka się brak odnośników literaturowych (przykładowo str. 37, 47);
- niektóre ryciny również nie posiadają odnośników literaturowych, na bazie których przygotowano ryciny do rozprawy (Rys.1-5);
- w przypadku cytowania innych prac, warto użyć skrótu „i wsp.” zamiast „i współpracownicy”;
- zamiast zwrotu „ładowanie leku”, lepiej użyć enkapsulowanie lub inkorporowanie leku;

- Autorka przeprowadziła analizę statystyczną co widać na prezentowanych wynikach, jednak brakuje opisu przeprowadzonych analiz;

- zauważono zwiększony nacisk na „Część literaturową” w odniesieniu do „Podsumowania”, warto przeredagować te fragmenty na korzyść „Dyskusji”.

Doktorantka wykorzystała szeroki zakres badań do realizacji zamierzonych celów, a otrzymane wyniki mogą stanowić kompleksowe rozwiązanie do badania enkapsulowanych leków. Stwierdzam, że przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie podjętego problemu naukowego. Warto zauważyć, że mikroukład prezentowany w rozprawie został nagrodzony przez Polski Związek Pracodawców Przemysłu Farmaceutycznego, oraz złotym medalem na Międzynarodowej Warszawskiej Wystawie Wynalazków. Otrzymane wyniki posiadają elementy nowości naukowej i stanowią doskonałą podstawę do publikacji w dobrze punktowanych czasopismach z reprezentowanej dyscypliny, a mogą też znaleźć odbiorców w przemyśle farmaceutycznym.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa Pani mgr Eweliny Wałęka-Bargieł pt.: **”Wykorzystanie mikro-/nanożeli czułych na warunki środowiskowe jako nośniki leków”**, spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U. z 2022 poz. 574 ze zm.). W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o **przyjęcie rozprawy oraz dopuszczenie Pani Eweliny Wałęka-Bargieł do dalszych etapów postępowania dotyczącego nadania stopnia doktorskiego**. Jednocześnie, biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, oraz aplikacyjność uzyskanych rozwiązań technologicznych, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne o **przyznanie wyróżnienia** Autorce dysertacji, Pani mgr Ewelinie Wałęka-Bargieł.

dr hab. inż. Julita Kulbacka, prof. UMW

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII  
MOLEKULARNEJ I KOMÓRKOWEJ

prof. ucz.   
dr hab. inż. Julita Kulbacka