

Warszawa, 03.02.2021 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Agaty Metery

pt. **„Środowiskowo czułe emulsje wielokrotne do uwalniania chemoterapeutyków”**

wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Ewy Dłuskiej, prof. uczelni
na Politechnice Warszawskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agaty Metery została przygotowana na Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesorowej Politechniki Warszawskiej, gdzie z ogromnym powodzeniem prowadzi się badania nad konstrukcją i praktycznym wykorzystaniem nowatorskich nośników mających za zadanie poprawienie dostarczania leków bezpośrednio do komórek zmienionych chorobowo, zwłaszcza tych „trudno dostępnych” dla klasycznych terapii. Poznanie mechanizmów leżących u podłoża tych procesów ma znaczenie nie tylko poznawcze, ale również ogromny potencjał praktyczny, gdyż efektywne dostarczanie leku jest kluczowe dla powodzenia terapii wielu schorzeń, w tym nowotworowych i neurodegeneracyjnych.

Doktorantka postawiła przed sobą ambitny cel wytworzenia stabilnych układów emulsji lipidowych ze złożoną hierarchiczną strukturą wewnętrzną w różnych wariantach oraz umieszczenia w nich klasycznego leku używanego do leczenia guzów mózgu, jakim jest doksorubicyna (DOX). Następnie przetestowała efektywności uwalniania DOX do komórek glejaków w hodowli *in vitro* oraz zbadania cytotoxycności. Swoją pracę doświadczalną Badaczka rozpoczęła od procedury testowania wielu różnych materiałów i parametrów – składników faz emulsji. Szczegółowo opisała i udokumentowała procedury, które ostatecznie doprowadziły do wytworzenia, a następnie scharakteryzowania oraz wybrania dwóch rodzajów emulsji o najkorzystniejszych założonych parametrach i zawierających wbudowaną doksorubicynę. Bardzo ciekawym pomysłem było zastosowanie materiału reagującego na zmiany pH, tj. soli sodowej karboksymetylocelulozy w

fazie zewnętrznej emulsji. Oba nośniki emulsyjne okazały się stabilne w przedziale czasowym siedmiu dni. Kolejnym podejściem doświadczalnym było przetestowanie otrzymanych emulsji jako nośników substancji leczniczej w hodowlach komórek linii nowotworowych glejaka wielopostaciowego *in vitro*. Wybrano trzy linie komórkowe, U-87 MG, LN229 i T98G. Emulsje wielokrotne bez enkapsulowanej DOX wykorzystane były do weryfikacji cytotoksyczności wybranego nośnika substancji czynnej. Oznaczano żywotność komórek przy pomocy standardowego testu metabolicznego, jakim jest AlamarBlue. Badania biologiczne Doktorantka rozpoczęła od doświadczeń kontrolnych polegających na sprawdzeniu, czy istnieje pozytywna korelacja pomiędzy liczbą wysianych komórek oraz czasem ich hodowli a intensywnością sygnału fluorescencyjnego, oznaczanego testem metabolicznym. Po uzyskaniu zadawalających wyników przystąpiła do ustalenia i wyboru do dalszych badań *in vitro* dawki DOX enkapsulowanego w emulsjach. Przeprowadzone badania doprowadziły do wyznaczenia wartości IC50, czyli minimalnego stężenia DOX hamującego w 50% żywotność komórek. Następnie Autorka przeprowadziła badania toksyczności w trzech punktach czasowych, stosując wybrany zakres stężeń. Eksperymenty obejmowały oznaczenie i porównanie żywotności komórek glejaków w obecności dwóch typów emulsji zawierających lub niezawierających doksorubicyny. Ponadto zbadała i porównała cytotoksyczność chemoterapeutyku dostarczonego w postaci emulsyjnej i w postaci roztworu. Wyniki pokazały, że emulsje niezawierające leku nie obniżały żywotności komórek nowotworowych. Natomiast emulsje z zawartym lekiem wykazały silne działanie toksyczne, obniżając żywotność glejaków do poziomu 1-5% lub 16%, odpowiednio w przypadku emulsji D1 lub D2. Dalsze eksperymenty pokazały, że DOX podana w roztworze, czyli w sposób klasyczny (tak jak podaje się ją pacjentom) wykazała słabszą cytotoksyczność w porównaniu do tych samych stężeń i czasu traktowania DOX w emulsjach, obniżając żywotność komórek do maksymalnie 24%. Kolejnym etapem pracy było oznaczenie szybkości uwalniania leku z emulsji w środowisku o pH neutralnym, charakterystycznym dla zdrowej tkanki oraz kwaśnym, które przypomina warunki panujące wewnątrz guza nowotworowego. Badania przeprowadzono zarówno w środowisku bez komórek, jak i w obecności glejaków. Analiza profili uwalniania chlorowodoru doksorubicyny wykazała, że w środowisku kwaśnym następowało jego szybsze uwalnianie w porównaniu ze środowiskiem o pH 7.4. To bardzo cenny wynik, który pokazuje, że uwalnianie leku z uzyskanych emulsji może zachodzić znacznie efektywniej i w krótszym czasie w guzie nowotworowym w porównaniu do tkanki zdrowej. Następnie udało się doświadczalnie

wyznaczyć stałą eliminacji substancji czynnej w obecności komórek. Okazało się, że uwalnianie DOX zachodzi szybciej z wielokrotnej emulsji o drobniejszych kroplach. Ostatnim ambitnym celem pracy doktorskiej było matematyczne modelowanie procesów nowotworowych i doświadczalna ocena wyników uzyskanych modeli. Umożliwiło to stworzenie modelu opisującego przebieg procesu uwalniania, transportu i eliminacji leku. Porównanie modelowych krzywych uwalniania substancji czynnej z emulsji z wynikami profili eksperymentalnych uwalniania DOX w środowisku komórek nowotworowych pokazało zgodność świadczącą o prawidłowym wyznaczeniu parametrów. Wyniki te umożliwiają przewidywanie i zaplanowanie dawki chemoterapeutyku na podstawie modelowania oraz danych eksperymentalnych.

Podsumowując, uzyskane wyniki przynoszą nowe, znaczące ustalenia w zakresie badań nad mechanizmem wytwarzania i zastosowania wielokrotnych emulsji lipidowych w celu dostarczenia chemoterapeutyków do komórek nowotworowych. Należy podkreślić, że wyniki te zostały już opublikowane w cenionych czasopismach. Doktorantka jest pierwszą autorką lub współautorką trzynastu prac doświadczalnych lub przeglądowych o podobnej tematyce oraz dwudziestu czterech doniesień na konferencjach zarówno krajowych jak i międzynarodowych. Część z tych materiałów również została opublikowana. Ponadto pani mgr inż. Agata Metera jest laureatką licznych nagród i stypendiów, które otrzymała podczas studiów doktoranckich, co pokazuje, że jej praca naukowo-badawcza została już doceniona przez szerokie gremium recenzentów.

Rozprawa doktorska pod względem edytorskim przygotowana jest wyjątkowo starannie. Nie byłam w stanie dopatrzeć się żadnych uchybień, z wyjątkiem czterech literówek. Doceniam też poprawność językową. Zdania są sformułowane jasno i logicznie, co bardzo ułatwia śledzenie i zrozumienie wyników skomplikowanych doświadczeń. Tekst opatrzony jest autorskim materiałem ilustracyjnym oraz zdjęciami wykonanymi w mikroskopii elektronowej. Fotografie te stanowią doskonałe wyniki. Manuskrypt jest obszerny, składa się z 198 stron i ma układ inny niż rozprawy doktorskie, z którymi dane mi było dotąd się zapoznać i recenzować. Były to prace z zakresu nauk biologicznych lub biologiczno-medycznych. Klasyczny układ takich rozpraw to oddzielne rozdziały typu: wstęp, materiały i metody, wyniki oraz dyskusja. Jednakże bardzo podoba mi obecnie recenzowana praca. Jest przejrzysta i ułatwia śledzenie skomplikowanych treści. Nie potrafię ocenić, czy jest to typowe dla rozpraw doktorskich wykonywanych na uczelniach politechnicznych, czy jest to własna inwencja twórcza Doktorantki. W każdym przypadku zasługuje na pochwałę.

Rozprawa podzielona została na osiem rozdziałów, z których każdy stanowi mniejszą całość. Opatrzona jest też streszczeniami w języku polskim i angielskim, podsumowaniem, spisem literatury i symboli oraz materiałem dodatkowym w formie załącznika. Szkoda tylko, że nie została dodana lista opublikowanych już prac Doktorantki. Pierwsza część rozprawy przedstawia i uzasadnia cel podjętych badań. Następne trzy rozdziały w obszerny sposób opisują aktualny stan wiedzy, dotyczący powstawania i progresji guzów nowotworowych ze szczególnym uwzględnieniem guzów mózgu oraz istniejących podejść terapeutycznych, takich jak klasyczne i nowoczesne strategie chemoterapeutyczne. Szczegółowo została przedstawiona charakterystyka nośników substancji aktywnych, w tym emulsji lipidowych i ich ewentualnego zastosowania w celu dostarczania i uwalniania substancji leczniczych do tkanki nowotworowej. Ciekawi mnie, czy opisane terapie przeciwnowotworowe z użyciem liposomów są stosowane w polskich szpitalach? Następne rozdziały zawierają zarówno wstęp, jak i opis wyników wraz ze zwięzłą dyskusją. Zabrakło mi tu jednak głębszej konfrontacji uzyskanych wyników z zastanym stanem wiedzy. Opisy warunków eksperymentalnych są w większości przypadków dokładne, choć skomplikowane i wystarczająco szczegółowe, by móc zostać powtórzonymi w niezależnych eksperymentach przez innych badaczy. Wartość opisanych nowych metod w pracy jest duża i oceniam ją wysoko. Wyniki prezentują cykl bardzo starannie zaplanowanych doświadczeń, poczynając od doświadczeń kontrolnych, następnie szczegółowych analiz aż do modelowania matematycznego na podstawie uzyskanych wyników biologicznych. Otrzymane dane pokazują, że Doktorantce udało się zrealizować wszystkie założone cele. Dwa ostatnie rozdziały to obszerne podsumowanie całości pracy wraz z wnioskami i określeniem sugestii postępowania terapeutycznego oraz spis literatury liczący 230 pozycji.

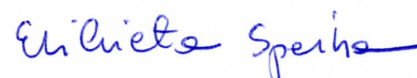
Uwagi szczegółowe:

1. Bardziej prawidłowe byłoby używanie terminu 'żywołność' zamiast 'przeżywalność' w badaniach cytotoxycności *in vitro*, jako że stosowano test oznaczający aktywność metaboliczną komórek (test AlamarBlue), a nie proliferację czy śmierć komórkową.
2. Rycina 6.17-6.20, 6.21-6.26, 6.27-6.32, 7.4 i 7.5-7.7 i 7.9-7.12: brak analizy statystycznej. Czy pokazane różnice były istotne statystycznie? Nie znalazłam istotności zaznaczonych na wykresie w postaci gwiazdek ani podanych informacji na ten temat w opisie doświadczenia.
3. Tabela 6.1: Uważam, że przydałby się opis także pod tabelą, a nie tylko w tekście.

4. Strona 117: w jaki sposób sprawdzano, czy chlorowodorek doksorubicyny nie adsorbuje się na płytkach? Zabrakło mi w opisie wyjaśnienia. Jest tylko stwierdzenie, że „Badania potwierdziły brak adsorpcji substancji oznaczonej na powierzchni wykorzystywanego sprzętu.”
5. Rozdział 8, strona 134-136: ponowny szczegółowy opis guzów nowotworowych nie wydaje mi się potrzebny. Jest to jednak moja subiektywna ocena, z którą Autorka ma prawo się nie zgodzić.

Wymienione powyżej nieliczne, drobne uwagi krytyczne nie mają wpływu na wartość merytoryczną pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Badania wykonane przez Doktorantkę są oryginalne i metodycznie nowatorskie, przynoszą znaczące ustalenia w zakresie wytwarzania i badań nad mechanizmem działania nowych nośników mających za zadanie dostarczenie leków do komórek glejaków. Z terapią przeciwnowotworową guzów mózgu opartą na nowych nośnikach leków wiąże się obecnie wielkie nadzieje, ponieważ są one odporne na klasyczną chemioterapię. Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do wyznaczenia nowych, potencjalnych celów terapeutycznych oraz opracowania nowatorskich strategii leczniczych. Na tej podstawie stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. „Środowiskowo czułe emulsje wielokrotne do uwalniania chemoterapeutyków” spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). Przedkładam zatem wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesorowej Politechniki Warszawskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową rozprawy doktorskiej, ze względu na istotność tematyki oraz osiągnięte wyniki, a także to, iż większa część rezultatów została już opublikowana w renomowanych czasopismach, wnioskuję o jej wyróżnienie.



dr hab. Elżbieta Speina