



Gdańsk, 25 stycznia 2021 r.

dr hab. inż. Donata Konopacka-Łyskawa
Katedra Inżynierii Procesowej i Technologii Chemicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska
ul. Narutowicza 11/12
80-233 Gdańsk

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Agaty Metery pt. „Środowiskowo czułe emulsje wielokrotne do uwalniania chemoterapeutyków”

wykonanej na Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej pod kierunkiem dr hab. inż. Ewy Dłuskiej, prof. uczelni.

Wprowadzenie

Według Światowej Organizacji Zdrowia nowotwory złośliwe są dużą grupą chorób, które mogą rozwijać się w prawie każdym narządzie lub tkance organizmu, a odpowiedzialne za nie są komórki rosnące nieprawidłowo w sposób niekontrolowany. Choroby nowotworowe są drugą najczęstszą przyczyną zgonów na świecie. Dlatego obserwuje się ciągły rozwój terapii, które pozwalają na ich leczenie. Postęp, jaki dokonał się w tej dziedzinie w ostatnich dwudziestu latach pozwala na skuteczne leczenie niektórych typów nowotworowych złośliwych. Niestety, pomimo intensywnych badań, jest jeszcze wiele odmian nowotworów, dla których stosowane metody leczenia nie są skuteczne. Recenzowana praca dotyczy badań nad terapią proponowaną do leczenia glejaka wielopostaciowego mózgu, który charakteryzuje się dużym stopniem złośliwości. Stosowane obecnie metody jego leczenia opierają się na połączeniu metod chirurgicznych (wycięcia guza) lub miejscowej radioterapii z leczeniem farmakologicznym, które może być podawane ogólnoustrojowo lub miejscowo. W pracy doktorskiej mgr inż. Agata Metera wykorzystwała emulsje wielokrotne jako nośnik chlorowodorku doksorubicyny, który jest lekiem cytostatycznym z grupy antybiotyków antracyklinowych, stosowanym w chemoterapii antynowotworowej. Lek ten jest przede wszystkim podawany drogą dożylną, dopęcherzowo lub w postaci aerozolu do inhalacji. Jednak w ostatnich latach prowadzone są badania nad wykorzystaniem różnych nośników, które pozwalałyby na kontrolowane uwalnianie tej substancji, po jej miejscowym podaniu. W tym celu proponowane są kapsułki i mikrokapsułki, emulsje, liposomy, nanoruki oraz micle. Badania przedstawione w pracy doktorskiej zostały

zrealizowane w ramach grantu NCN „Emulsyjne platformy do kontrolowanego i selektywnego uwalniania leków” (Opus 7, 214/13/B/ST8/04274), którego kierownikiem była dr hab. inż. Ewa Dłuska. Opracowywana przez zespół dr hab. inż. E. Dłuskiej metoda z wykorzystaniem emulsji wielokrotnych jako nośnika substancji czynnej do aplikacji miejscowej chemoterapeutyku jest rozwiązaniem, które nie było wcześniej stosowane w terapii raka mózgu. Dlatego uważam, że wybór problemu badawczego za w pełni uzasadniony zarówno z teoretycznego jak i praktycznego punktu widzenia.

Charakterystyka pracy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska ma charakter eksperymentalny z elementami rozważań teoretycznych. Zaplanowane i przeprowadzone doświadczenia zostały wykonane w celu zdobycia informacji niezbędnych do opisu matematycznego nieustalonego transportu masy w układach wielofazowych z emulsji wielokrotnych do komórek nowotworowych.

Dysertacja składa się z dziesięciu rozdziałów i liczy 198 stron tekstu, w którym znajduje się 14 tabel i 77 rysunków. Dwa pierwsze rozdziały to *Wstęp i uzasadnienie podjętej tematyki* oraz *Cel i zakres pracy*. Część teoretyczna pracy przedstawiona jest w rozdziałach od trzeciego do piątego oraz w rozdziale ósmym. Natomiast opis metodyki przeprowadzonych badań doświadczalnych, otrzymane wyniki i ich dyskusję zawarto w rozdziale szóstym i siódmym, a metodykę i wyniki symulacji numerycznych w rozdziale dziewiątym. Ostatni numerowany rozdział stanowią *Wnioski*. Poza tym w pracy zamieszczono streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych symboli, spis literatury liczący 230 pozycji oraz jeden załącznik. Układ pracy odbiega od typowych rozpraw doktorskich, w których najczęściej jest wyodrębniona część teoretyczna i część badawcza. Jednak zakres i charakter pracy uzasadnia zastosowane podejście do przedstawienia omawianych zagadnień teoretycznych i otrzymanych wyników w sposób, w którym zgrupowane są części odnoszące się do badań eksperymentalnych i do modelowania procesu.

W rozdziale pierwszym mgr inż. Agata Metera zawarła krótkie wprowadzenie do tematu pracy, w którym przedstawiła metody leczenia glejaka mózgu oraz wskazała na zastosowanie implantu emulsyjnego, jako metody pozwalającej uzyskać efekt przedłużonego uwalniania leku podczas miejscowej farmakoterapii. Ponadto przytoczyła dane pokazujące wysokie koszty leczenia chorób nowotworowych i uzasadniła stosowanie leków antynowotworowych z wykorzystaniem nośników względami ekonomicznymi, gdyż z jednej strony zmiana formy leku bez zmiany substancji czynnej pozwala skrócić czas opracowania leku, a drugim aspektem jest możliwość zwiększenia skuteczności leku oraz zmniejszenie liczby powikłań, co wpływa na obniżenie kosztów terapii wykorzystującej chemoterapeutyk podany w nowej formie.

Rozdział drugi zawiera cele pracy, który obejmowały opracowanie metody wytwarzania emulsji wielokrotnych wykorzystywanych do kontrolowanego uwalniania chlorowodoru doksorubicyny w środowisku komórek glejaka wielopostaciowego, zbadanie odpowiedzi komórek na lek podany w tej formie oraz wyznaczenie parametrów modelu matematycznego

procesu transportu masy z wnętrza emulsji do środowiska komórek nowotworowych. W rozdziale tym Autorka przedstawiła również szczegółowy zakres wykonanych prac.

W rozdziale trzecim dysertacji mgr inż. Agata Metera w zwięzły sposób opisała charakterystykę guzów nowotworowych i metody leczenia nowotworów mózgu. W kolejnych podrozdziałach przedstawiła strukturę guzów nowotworowych i jej zmiany w różnych fazach wzrostu guza oraz zmiany metabolizmu komórek nowotworowych, którego efektem jest obniżenie pH środowiska na zewnątrz tych komórek. Omawiając metody leczenia guzów mózgu, Autorka skupiła się na różnych rodzajach chemoterapii zarówno należących do grupy metod tradycyjnych jak i niestandardowych. Rozdział ten stanowi wstępne uzasadnienie podjętej tematyki badawczej, które jest dalej rozwinięte w rozdziale czwartym, przedstawiającym wykorzystanie różnych nośników substancji czynnej w chemoterapii nowotworów. Autorka scharakteryzowała w nim szczegółowo układy emulsyjne, w tym emulsje wielokrotne, ich stabilność oraz mechanizmy destabilizacji tych układów. Zebrała tu przykłady zastosowań różnych nośników leków do terapii antynowotworowych, w tym badania dotyczące podawania chlorowodorku doksorubicyny. Autorka opisała też mechanizm uwalniania substancji z nośnika z wykorzystaniem bodźca, którym może być np. zmiana pH, temperatura, pole magnetyczne czy promieniowanie elektromagnetyczne. W rozdziale piątym Autorka przedstawiła zagadnienia dotyczące kinetyki uwalniania substancji czynnej. W rozdziale tym opisała różnice w profilach stężenia, które występują dla różnych sposobów uwalniania substancji aktywnej z leku.

Kolejne dwa rozdziały dysertacji zawierają opis części eksperymentalnej. W rozdziale szóstym mgr inż. Agata Metera przedstawiła metodykę otrzymywania emulsji wielokrotnych typu $W_1/O/W_2$ bez substancji aktywnej i z dodatkiem chlorowodorku doksorubicyny do wewnętrznej fazy wodnej, ich charakterystykę obejmującą ocenę typu emulsji, ich stabilności, rozkłady wielkości kropeł w fazie wodnej wewnętrznej i w fazie olejowej membranowej, krzywe lepkości oraz pomiary napięcia międzyfazowego na granicy faz woda-olej dla fazy zewnętrznej i membranowej. W rozdziale tym zawarła też opis metodyki stosowanej w badaniach cytotoksyczności emulsji metodą *in vitro* oraz wyniki przeżywalności trzech badanych linii komórek glejaka wielkopostaciowego w zależności od stężenia chlorowodorku doksorubicyny i czasu kontaktu komórek z lekiem oraz sposobu dostarczenia chemoterapeutyku do układu (w postaci roztworu oraz dwóch rodzajów emulsji). Wyniki te pozwoliły Autorce określić zakres stężeń substancji aktywnej w prowadzonych badaniach oraz wykazać, że sposób dostarczania chlorowodorku doksorubicyny wpływa na przeżywalność badanych linii komórkowych. W siódmym rozdziale pracy opisano metodykę badań kinetyki uwalniania chlorowodorku doksorubicyny w środowisku bez komórek oraz w obecności komórek nowotworowych. Szybkość uwalniania substancji leczniczej wyznaczono dla różnych jej stężeń w układzie oraz dla czasów uwalniania w zakresie do 24 godzin. Zbadano też wpływ pH na szybkość uwalniania chlorowodorku doksorubicyny w środowisku bez komórek. Wyniki te pozwoliły na wyznaczenie stałej szybkości eliminacji substancji czynnej w środowisku komórek na podstawie logarytmicznej zależności ułamka masowego leku dostępnego w układzie w czasie jego uwalniania. Ze względu na złożony mechanizm przemian, które zachodzą podczas wprowadzenia leku do środowiska komórek, otrzymane wartości stałej szybkości są tzw.

zastępczymi stałymi szybkości konsumpcji chlorowodorku doksorubicyny w środowisku komórek.

W rozdziale ósmym dysertacji Autorka przedstawiła koncepcje modelowania matematycznego procesów zachodzących w układach biologicznych. Największą grupą modeli matematycznych są modele, w których analizowana jest zmiana liczby komórek podczas ich wzrostu. Druga grupa modeli wykorzystuje do opisu transport składników aktywnych do komórek nowotworowych, zakładając, że transportowana substancja wpływa na wzrost guza. W przypadku guzów nieunaczynionych model jest równaniem dyfuzji z reakcją chemiczną, natomiast w przypadku guzów unaczynionych uwzględnia się też transport konwekcyjny. Trzecią grupą modeli są modele bioinformatyczne, które wykorzystując narzędzia matematyczne, sieci i bazy danych, pozwalają na przewidywanie zachowania układu na poziomie komórkowym. Rozdział ten stanowi wprowadzenie teoretyczne do kolejnej części pracy, w którym przedstawiono model opisujący uwalnianie chlorowodorku doksorubicyny z emulsyjnego implantu do otaczających go komórek. Równania, wchodzące w skład modelu zostały zaproponowane wcześniej przez promotora tej pracy jako opis uwalniania i transportu masy składnika z emulsji wielokrotnych w symulowanym środowisku guza. Mgr inż. Agata Metera obliczyła współczynniki potrzebne, aby wykorzystać model matematyczny do opisu badanego układu: molekularne współczynniki dyfuzji chlorowodorku doksorubicyny w fazie w fazie membranowej i w fazie zewnętrznej emulsji, efektywne współczynniki dyfuzji w tych fazach uwzględniające charakterystykę otrzymanych emulsji, objętościowy współczynnik wnikania masy w fazie membranowej, podała równowagowe współczynniki podziału transportowanej substancji dla fazy membranowej i wewnętrznej oraz dla fazy membranowej i zewnętrznej w badanych emulsjach oraz obliczyła stałe szybkości eliminacji chlorowodorku doksorubicyny dla założonych składów kokultur dwóch linii komórek nowotworowych na podstawie wyznaczonych we wcześniejszych doświadczeniach stałych szybkości dla pojedynczych linii komórkowych. Kolejnym krokiem w tej części było rozwiązanie numeryczne równań modelu w celu określenia zmian masy chlorowodorku doksorubicyny w fazie zewnętrznej oraz średniego stężenie leku w tej fazie w czasie jego uwalniania z emulsji.

Pracę kończy zestawienie wniosków odnoszących się do wytwarzania i charakterystyki emulsji wielokrotnych, cytotoksyczności chlorowodorku doksorubicyny podawanego w nośniku emulsyjnym, szybkości uwalniania substancji czynnej z emulsji oraz porównania wyników doświadczalnych uwalniania i konsumpcji chemoterapeutyku z wynikami uzyskanymi jako rozwiązania równań modelu matematycznego.

Ocena merytoryczna pracy

Pani mgr inż. Agata Metera w przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej zajęła się ważnym zagadnieniem, którym jest dostarczanie substancji aktywnej w leczeniu glejaka wielopostaciowego mózgu. Zaproponowany w pracy sposób dostarczenia leku w postaci emulsji wielokrotnych nie był wcześniej stosowany do terapii raka mózgu.

Badania przeprowadzone przez Autorkę pracy pozwoliły na otrzymanie stabilnych emulsji typu $W_1/O/W_2$, które zostały wykorzystane jako nośnik chlorowodorku doksorubicyny.

Zastosowanie soli sodowej karboksymetylocelulozy w zewnętrznej fazie wodnej skutkowało zmniejszeniem lepkości pozornej emulsji wraz z obniżeniem wartości pH środowiska, które występuje w otoczeniu komórek nowotworowych. Właściwość ta została wykorzystana jako bodziec wpływający na szybkość uwalniania chlorowodoru dokсорubicyny z fazy emulsyjnej. Charakterystyka emulsji została zaplanowana i wykonana poprawnie. W pracy wykorzystywano dwie emulsje o zbliżonym stopniu enkapsulacji substancji czynnej, ale różniących się średnią wielkością kropeł fazy membranowej (olejowej) i wewnętrznej fazy wodnej. Otrzymane emulsje zawierające chlorowodorek dokсорubicyny wykazywały skuteczność hamowania wzrostu komórek trzech badanych linii komórek glejaka wielopostaciowego nowotworowych. W pracy wykazano zależność skuteczności terapeutycznej od charakterystyki emulsji stosowanej jako nośnik chemoterapeutyku. Przy czym wyższą skuteczność hamowania wzrostu komórek nowotworowych wykazywała substancja aktywna podana w formie emulsji, w której znajdowało się wiele małych kropeł w stosunkowo dużej kropli fazy membranowej.

Ważną częścią pracy było wyznaczenie stałych szybkości uwalniania substancji czynnej z emulsji do środowiska komórek. Szybkość uwalniania chlorowodoru dokсорubicyny była wyższa w środowisku o wartości pH równym 6,3, co jest potwierdzeniem właściwego doboru składu fazy zewnętrznej emulsji. Wykazano też zależność szybkości uwalniania i konsumpcji chemoterapeutyku od charakterystyki emulsji. Wyższą szybkość uwalniania leku i jego konsumpcji otrzymano, gdy nośnikiem chemoterapeutyku była emulsja o mniejszych kroplach fazy membranowej zawierających pojedynczą kroplę fazy wewnętrznej.

Obliczenia modelowe szybkości uwalniania chlorowodoru dokсорubicyny z wykorzystaniem modelu zostały wykonane dla kokultury komórek przy założeniu, że stałą szybkości w takim układzie można obliczyć jako średnią ważoną, proporcjonalną do udziału liczby komórek danej linii. Wyznaczone z wykorzystaniem modelu zależności stężenia substancji aktywnej uwalnianej z emulsji w czasie wykazują dobrą zgodność z wartościami wyznaczonymi na podstawie pomiarów doświadczalnych, co potwierdza poprawność przyjętych założeń w modelu w zakresie do 24 godzin, gdyż ten zakres czasu odpowiada wykonanym doświadczeniom w obecności komórek. Dlatego też wyniki otrzymane podczas symulacji przebiegu procesu uwalniania i konsumpcji leku w czasie dłuższym są tylko przewidywaniami i powinny być zweryfikowane doświadczalnie.

W moim przekonaniu Pani mgr inż. Agata Metera w pełni zrealizowała zaplanowany zakres i plan badań dla osiągnięcia założonych celów poznawczych oraz udowodniała tezy przyjęte w rozprawie doktorskiej. Rozprawa jest spójna, a wnioski są sformułowane w sposób poprawny. Należy podkreślić, że recenzowana rozprawa doktorska powstała na styku kilku dyscyplin i specjalności naukowych takich jak, inżynieria chemiczna i procesowa, inżynieria biomedyczna i farmakokinetika. Autorka pracy wykazała, że opanowała warsztat laboratoryjny niezbędny do otrzymywania i charakterystyki układów zdyspergowanych, jak również do prowadzenia badań z materiałem komórkowym w zakresie potrzebnym do określenia cytotoksyczności badanej substancji oraz do wyznaczenia szybkości konsumpcji chlorowodoru dokсорubicyny w obecności komórek nowotworowych.

Oceniając pracę w ujęciu edytorskim stwierdzam, że praca jest napisana poprawnym językiem, chociaż Autorka nie ustrzegła się tzw. literówek czy drobnych nieścisłości. Jednak nie są to liczne nieprawidłowości, dlatego nie wymieniam ich szczegółowo w tej recenzji. Szata graficzna dysertacji jest estetyczna, zamieszczone w pracy tabele, rysunki i wykresy są czytelne. Kolejne wątki poruszane w pracy są ze sobą powiązane, zaś przedstawiony opis prowadzonych badań pozwala na ich odtworzenie. Jednak jako recenzent muszę zauważyć, że w pracy znajdują się powtórzenia, które dla uważnego czytelnika stanowią pewien dyskomfort w lekturze, np. dwa razy zamieszczone informacje o składzie i warunkach wytwarzania emulsji na stronach 71 w tekście, a na stronie 115 zaprezentowane w tabeli 7.2, czy opis struktury tkanki nowotworowej na stronach 20-21 oraz 134-136.

Wysoko oceniam aktywność naukową Pani mgr inż. Agaty Metery, na którą składają się cztery artykuły naukowe opublikowane w czasopismach w listy JCR oraz dziewięć innych artykułów recenzowanych, które dotyczą zagadnień związanych z problemami poruszonymi w rozprawie doktorskiej. Autorka pracy zaprezentowała swoje osiągnięcia naukowe na osiemnastu konferencjach i sympozjach oraz na dwóch seminariach wydziałowych Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej. Warto podkreślić, że Pani Agata Metera była też wielokrotnie wyróżniana za działalność naukową

Uwagi i zapytania merytoryczne

Podczas lektury rozprawy doktorskiej nasunęły mi się pewne uwagi oraz spostrzeżenia do rozważenia i dyskusji:

1) W pracy używano określenia pH neutralne, dla wartości $\text{pH}=7,4$, która charakteryzuje zdrowe tkanki. Nie jest to określenie precyzyjne, bo jest to odczyn słabo zasadowy.

2) Warto w przyszłej pracy naukowej uzupełniać charakterystykę używanych odczynników chemicznych o informacje dotyczące ich czystości (w rozprawie doktorskiej tylko dla chlorowodoru doksorubicyny podano, że był to odczynnik do HPLC).

3) W pracy nie wyjaśniono w jaki sposób wyznaczone były wartości współczynników podziału chlorowodoru doksorubicyny między fazę wodną i membranową.

4) Moim zdaniem brakuje w pracy dyskusji, która wyjaśniłaby dlaczego emulsja z enkapsulowanym chlorowodorkiem doksorubicyny o mniejszych kroplach fazy wewnętrznej zawartych w stosunkowo dużych kroplach fazy membranowej wykazywała większą cytotoksyczność, podczas gdy szybkość uwalniania i konsumpcji substancji czynnej była większa z emulsji o mniejszych kroplach fazy membranowej z pojedynczą kroplą wewnętrznej fazy wodnej.

5) Czy przeprowadzono obliczenia z wykorzystaniem modelu dla czystych linii komórkowych?

Powyższe uwagi nie mają wpływu na wysoką oceną recenzowanej pracy. Uważam, że zaprezentowane wyniki i wnioski końcowe są interesujące z punktu widzenia poznawczego jak i możliwości wykorzystania badanej metody do transportu chemoterapeutyku.

Podsumowanie

Recenzowana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego związanego z otrzymywaniem emulsji wrażliwych na zmiany pH środowiska oraz transportem masy składnika czynnego z emulsji do środowiska komórek. Sposób zaplanowania eksperymentów i realizacja badań oraz forma przedstawienia otrzymanych wyników i ich analiza, świadczą, że Pani mgr inż. Agata Metery posiada umiejętności i kompetencje do samodzielnego prowadzenia pracy badawczej. Za najważniejsze osiągnięcie Pani mgr inż. Agaty Metery uważam otrzymanie stabilnych emulsji wielokrotnych z enkapsulowanym chlorowodorkiem doksorubicyny, którego szybkość uwalniania może być kontrolowana przez zmianę pH środowiska oraz wyznaczenie kinetyki uwalniania substancji czynnej z emulsji do środowiska komórek nowotworowych. Otrzymane w tej pracy wyniki badań są wartościowe i mogą przyczynić do rozwoju metod leczenia glejaka wielopostaciowego mózgu.

Na podstawie recenzji rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Agaty Metery zatytułowanej „Środowiskowo czule emulsje wielokrotne do uwalniania chemoterapeutyków” stwierdzam, że praca doktorska spełnia wymogi 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. Nr 65 poz. 595 wraz z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Politechniki Warszawskiej o jej przyjęcie i dopuszczenie Pani mgr inż. Agaty Metery do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc po uwagę zawartość recenzowanej pracy, jej poziom naukowy oraz dorobek naukowy Autorki w postaci publikacji naukowych oraz prezentacji konferencyjnych wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Chemiczna o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.

D. Kozupnicko-Tyszkiewicz