



WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD BIOTECHNOLOGII BIAŁEK
ul. Joliot-Curie 14a, pok. 3.30
50-383 Wrocław | Poland

tel. +48 71 375 29 29
fax +48 71 375 76 61

Prof. dr hab. lek. med. Ewa Marcinkowska
ema@cs.uni.wroc.pl

Wrocław 4 lutego 2021

RECENZJA

ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR INŻ. KAMILI SZOSTAK-PALUCH

ZATYTUŁOWANEJ „KOMÓRKOWY MODEL FARMAKOKINETYCZNY PRZEZNACZONY DO TESTOWANIA KIEROWANYCH
NOŚNIKÓW LEKÓW” WYKONANEJ W KATEDRZE INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ, POLITECHNIKI WROCŁAWSKIEJ

POD KIERUNKIEM PROMOTORA PROF. DR HAB. INŻ. MARKA LANGNERA
ORAZ PROMOTORA POMOCNICZEGO DR HAB. INŻ. MAGDALENY PRZYBYŁO

1. Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Przedmiotem recenzji jest dysertacja doktorska pani mgr inż. Kamili Szostak-Paluch zatytułowana „Komórkowy model farmakokinetyczny przeznaczony do testowania kierowanych nośników leków” wykonana pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Inż. Marka Langnera, oraz promotora pomocniczego, pani dr hab. inż. Magdaleny Przybyło. Podstawą formalną opracowania recenzji jest pismo z dnia 9 grudnia 2020 (nr K65W11D04/372/2020) od Przewodniczącej Komisji ds. Stopni Naukowych w Dyscyplinie Inżynieria Biomedyczna, pani prof. dr hab. inż. lek. Haliny Podbielskiej, w sprawie powierzenia mi oceny rozprawy doktorskiej mgr inż. Kamili Szostak-Paluch. Recenzja ma na celu ustalenie, czy rozprawa spełnia wymogi określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z dnia 27 września 2017 poz. 1789).

2. Formalna ocena pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma układ typowy dla rozpraw doktorskich o charakterze eksperymentalnym. Została napisana klarownym i poprawnym językiem. Błędy literowe, gramatyczne i składniowe nie są liczne, więc nie będę ich wymieniać. Rozprawa liczy 181 stron i składa się z następujących rozdziałów: streszczenie, wstęp, cele i założenia pracy, materiały, metody, wyniki i dyskusja, podsumowanie oraz spis literatury. W pracy odnotowano, że była finansowana z Narodowego Centrum Nauki w ramach programu PRELUDIUM 13 na realizację projektu „Model transportu nanoagregatów lipidowych przez komórki nabłonkowe z uwzględnieniem dalszych etapów farmakokinetycznych”, nr identyfikacyjny: UMO-2017/25/N/NZ7/02165.



3. Ocena merytoryczna zawartości początkowych części rozprawy

Wstęp jest najlepiej napisaną częścią pracy. Obejmuje 44 strony, na których podjęto szeroki zakres tematów. Opisano w nim nano-farmaceutyki, głównie liposomy, normy obowiązujące w badaniach farmaceutyków, pewne aspekty badań z zakresu biologii molekularnej, mechanizmy endocytozy liposomów, środki przeciwbakteryjne, leki przeciwnowotworowe oraz związki żelaza w postaciach liposomowych, a także modele komórkowe do badań *in vitro*. Mimo tak szerokiego zakresu tematycznego, wstęp jest napisany z dużym zrozumieniem poruszanych zagadnień i dobrze się go czyta. Następnie autorka przedstawiła **cele i założenia pracy**. Autorka napisała, że „głównym celem prezentowanych badań jest rozwinięcie metodologii pozwalającej na powiązanie parametrów nano-farmaceutyków z ich efektywnością”. Moim zdaniem tak sformułowany cel nie jest zgodny z tytułem rozprawy. Ten właśnie cel był realizowany, a tytuł rozprawy jest niefortunnie sformułowany i mylący. Odniosę się do tego w dalszej części recenzji.

Rozdział **materiały** liczy około 4 stron i wydaje mi się kompletny.

Reasumując, powyżej opisane rozdziały są właściwie napisane i nie mam do nich żadnych zastrzeżeń.

4. Ocena merytoryczna zawartości dalszych rozdziałów rozprawy

Rozdział **metody** liczy 23 strony. Opisano w nim szereg metod z zakresu przygotowania liposomowych form leków, hodowle komórek bakteryjnych, hodowle linii komórek nowotworowych, metody badania aktywności przeciwbakteryjnej, metody badania cytotoksyczności, metody badania wnikania liposomów do komórek, metodę badania ekspresji genów w komórkach, metodę badania poziomu białek w komórkach, metodę oznaczania reaktywnych form tlenu w komórkach oraz symulacje prowadzone metodą dynamiki molekularnej. Nie czuję się kompetentna do oceny poprawności metod z zakresu przygotowania liposomowych form leków, ani symulacji błon lipidowych prowadzonych metodą dynamiki molekularnej, mam nadzieję że drugi recenzent jest w stanie ocenić ten fragment rozprawy.

Pozostałe metody znam dobrze i dlatego muszę przyznać, że uważam za błędny jeden element metody opisanej na stronach 79 i 80 (przygotowanie hodowli komórek do testu MTT). Komórki te dwukrotnie wysiewano na płytki 96-cio dołkowe. Po raz pierwszy po 10 tysięcy komórek wysiano do dołków, a po 24 godzinach ponownie wysiano je do dołków na takiej samej płytce. Wydaje się, że to błędne postępowanie, ponieważ zebranie komórek z dołka w 96-dołkowej płytce jest trudne i na pewno nie wszystkie komórki zostają przeniesione. Ponadto, w rozdziale metody nie znalazłam informacji o liczbie powtórzeń wykonywanych eksperymentów.

Kolejny rozdział to opis **wyników** i ich **dyskusja**. Pierwszym opisanym i scharakteryzowanym preparatem jest liposomowa formuacja oktenidyny, której aktywność określono badając zahamowanie wzrostu bakterii *E.coli*, w zależności od czasu kontaktu bakterii z preparatem. Aktywność badanej formuacji porównano do aktywności dostępnego komercyjnie Octaniseptu®, a wyniki zbiorcze przedstawiono na rysunku 16. W opisie wyników autorka stwierdziła, że „formuacja komercyjna wydaje się być bardziej efektywna”. Gdyby autorka wykonała analizę statystyczną otrzymanych wyników, mogłaby użyć bardziej naukowo brzmiącego sformułowania.

W następnej części rozdziału opisano kilka formuacji liposomowych oktenidyny i kilka formuacji liposomowych chlorheksydyny, scharakteryzowano ich rozmiary, stabilność, wbudowanie sond fluorescencyjnych, a następnie modelowano sposób wbudowania oktenidyny do błony liposomów za metodą dynamiki molekularnej. Niestety aktywność tych preparatów nie była już sprawdzana na bakteriach.

W kolejnej części rozdziału opisano i scharakteryzowano szereg liposomowych formuacji doksorubicyny. Jedną z badanych cech był poziom zamknięcia doksorubicyny obliczony wg wzoru ze strony 114. Na ile rozumiem symbole podane we wzorze, to wzór ten pozwala wyliczyć poziom niezamkniętej w liposomach doksorubicyny (jeśli tak jak podano DOX_{uf} to doksorubicyna zmierzona w roztworze poza liposomami).

Dalej opisano dwanaście liposomowych formuacji związków żelaza. Jednym z badanych związków był Ferrum Lek, który na stronie 115 nazwano kompleksem tlenku żelaza III z dekstranem, a na stronie 116 kompleksem żelaza III z izomaltozą. Co najmniej jeden z tych dwóch opisów preparatu Ferrum Lek musi być błędny. Również w tym akapicie mam wątpliwość co do prawidłowości wzoru na wydajność zamykania związków żelaza (str. 120).

Kolejny podrozdział w założeniu miał być opisem endocytozy stworzonych wcześniej liposomowych form leków. Endocytozę badano w dwóch modelach komórkowych z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Linie komórkowe wykorzystane w badaniach to mysie makrofagi J774A.1 oraz ludzki nowotwór piersi SK-BR-3. Badano inkorporację wolnej postaci doksorubicyny, liposomowej doksorubicyny dostępnej komercyjnie (Caelyx®) oraz znakowanych rodaminą, niezawierających doksorubicyny lecz dekstran liposomów przygotowanych przez autorkę. O ile rozumiem dobór dwóch leków kontrolnych, to nie potrafię zrozumieć dlaczego autorka nie wykorzystwała przygotowanej przez siebie liposomowej formuacji doksorubicyny do tych eksperymentów. Również nie rozumiem doboru metodyki i prezentacji uzyskanych wyników. Jeśli chce się badać proces endocytozy, a następnie transportu do jądra komórkowego z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej, należy użyć fluorescencyjnych znaczników pozwalających na ocenę lokalizacji w endosomach oraz w jądrze komórkowym. Wówczas badając tzw. kolokalizację, można z dużą dozą pewności stwierdzić miejsce

docelowe endocytowanej substancji. Niestety autorka nie użyła żadnego znacznika, więc lokalizacji preparatów można się jedynie domyślać. Ponadto na rysunku 28 zdjęcia D-F są wykonane w innym powiększeniu, niż wszystkie pozostałe. Z przykrością muszę stwierdzić, że jakość prezentowanych zdjęć nie przekracza możliwości zwykłego mikroskopu fluorescencyjnego.

Paragraf 6.4.2 zatytułowany jest „Endocytoza formulacji liposomowej dokсорubicyny”. Na stronie 132 autorka napisała, że „zapropozowano kompleksową analizę z wykorzystaniem techniki real-time PCR. Metoda ta umożliwia ocenę stopnia zaangażowania poszczególnych szlaków w procesie internalizacji liposomów z różnorodną strukturą części wewnętrznej na poziomie genetycznym”. Niestety nie mogę zgodzić się z tym stwierdzeniem. Metoda real-time PCR służy do badania ekspresji genów w sposób porównawczy (w odniesieniu do ekspresji innego genu) lub ilościowy (w odniesieniu do krzywej standardowej dla badanego transkryptu). Z kolei poziom ekspresji badanego genu zależy od bardzo wielu czynników, w tym od aktualnego zapotrzebowania komórki na kodowane przezeń białko, od stabilności białka, od obecności mikroRNA itp. Nie ma mocnych przesłanek, aby sądzić że ekspresja genów kodujących białka budujące pęcherzyki endocytarne zależy od aktualnie używanej przez komórkę ścieżki endocytarnej. Są natomiast dostępne modele komórkowe pozbawione wybranych białek zaangażowanych w różne ścieżki endocytozy. Przez porównanie wydajności endocytozy w takim modelu z endocytozą w tzw. modelu dzikim można wnioskować o zaangażowaniu danego białka w proces endocytozy badanego cargo.

Na końcu podrozdziału 6.4.2 autorka napisała, że „kolejnym naturalnym krokiem było sprawdzenie czy wzrost ekspresji na poziomie mRNA będzie korelował z ekspresją na poziomie białka”, po czym pokazała wynik eksperymentu Western blot, w którym badano całkowity poziom łańcucha ciężkiego klatryny w komórkach HEP-G2 oraz SK-HEP-1 (wywodzących się z nowotworów wątroby) po ekspozycji na dwa rodzaje liposomów. O ile w komórkach HEP-G2 białko zostało uwidocznione, to w komórkach SK-HEP-1 już nie. Niestety nie wiadomo, czy te poziomy korelują z wynikami otrzymanymi w real-time PCR, ponieważ wyniki uzyskane w tej drugiej metodzie nie były ilościowe. Poza tym, aby potwierdzić lub zaprzeczyć istnieniu korelacji, konieczna jest analiza statystyczna, a tej brakuje.

W dalszej części rozdziału opisano wyniki badania cytotoksyczności formulacji liposomowych dokсорubicyny. Wykorzystano w tych badaniach test MTT, najbardziej rutynowy test stosowany w badaniach cytotoksyczności, którego dużą zaletą jest wysoka przepustowość. Badano dwie formulacje liposomowe dokсорubicyny wytworzone przez autorkę, komercyjnie dostępny Caelyx®, puste liposomy i liposomy zawierające heparynę (kontrola do jednego z preparatów wytworzonych przez autorkę). Badania zostały prawidłowo wykonane, natomiast w analizie uzyskanych wyników ponownie brakuje statystyki.

Dalej przedstawiono wyniki badania aktywności formułacji liposomowych żelaza. W pierwszej kolejności badano cytotoksyczność preparatów testem MTT. Dobór tego testu jest dla mnie niezrozumiały, ponieważ aktywność preparatów żelaza nie powinna polegać na zabijaniu komórek. Są dostępne fluorescencyjne sondy, które przenikają do wnętrza komórek (np. calcein-AM), których można użyć aby badać efektywność dostarczania jonów żelaza do wnętrza komórki. W dalszej kolejności zbadano wpływ stosowanych liposomowych formułacji żelaza na powstawanie reaktywnych form tlenu. Tutaj nie mam zastrzeżeń do doboru testu, natomiast znowu w przedstawionych wynikach brakuje analizy statystycznej.

Kolejny rozdział rozprawy to **podsumowanie**. Na początku tego rozdziału autorka napisała, że „Eksperymenty przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej pozwoliły na określenie wpływu struktury nanonośnika lipidowego na efektywność dostarczania substancji aktywnej do wytypowanych linii komórkowych”. Mogłabym się zgodzić z tym stwierdzeniem, gdyby przedstawione wyniki były poddane analizie statystycznej.

Ostatni rozdział to spis **literatury**, obejmujący 439 pozycji. Pozycje bibliografii są właściwie dobrane i starannie edytowane.

5. Dodatkowe uwagi krytyczne

Część zastrzeżeń dotyczących doboru metod czy braku analizy statystycznej wyników eksperymentów opisałam w poprzednich częściach recenzji. Teraz chcę wyjaśnić moje najważniejsze zastrzeżenie dotyczące przedstawionej do oceny rozprawy. Tytuł rozprawy brzmi: „Komórkowy model farmakokinetyczny przeznaczony do testowania kierowanych nośników leków”. Tytuł sugeruje, że w ramach pracy doktorskiej stworzono jakiś uniwersalny układ badawczy, do którego można dostarczać badane formułacje liposomowe leków i uzyskiwać z niego dane dotyczące farmakokinetyki tych leków. Farmakokinetyka, to badanie losów podanego leku w organizmie opisanych według schematu LADME:

L – liberation (uwolnienie)

A – absorption (wchłanianie)

D – distribution (rozmieszczenie)

M – metabolism (metabolizm)

E – elimination (usuwanie).

Model badawczy, zastępujący zwierzęta eksperymentalne w badaniach farmakokinetyki byłby bardzo przydatny, niestety oceniana praca go nie dostarczyła.

Podsumowując, mam pewną trudność w uznaniu tej rozprawy za spełniającą wymogi ustawowe. Moim zdaniem, rozprawa ma braki, które wymieniłam w mojej recenzji, ale przede wszystkim nosi tytuł, który nie odpowiada treści rozprawy. Dlatego chciałabym skorzystać z możliwości opisanej w Rozporządzeniu

MNiSW z dnia 26 września 2016 r. „w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie. doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora”. § 6 p. 6 tego Rozporządzenia stwierdza, że „recenzja może zawierać wnioski dotyczące uzupełnienia lub poprawy rozprawy doktorskiej, które rada jednostki organizacyjnej przeprowadzającej przewód doktorski przekazuje kandydatowi i promotorom, o których mowa w § 2 ust. 1 i ust. 2 pkt 1 i 2. Uzupełnioną lub poprawioną rozprawę doktorską kandydat przedkłada radzie jednostki organizacyjnej przeprowadzającej przewód doktorski, która kieruje ją do ponownej oceny przez tych samych recenzentów. Recenzenci przedstawiają recenzję uzupełnionej lub poprawionej rozprawy doktorskiej w terminie miesiąca od dnia zlecenia sporządzenia tej recenzji.”

Niestety, wydaje mi się że oczekiwanie aby treść pracy została dopasowana do bardzo obiecująco brzmiącego tytułu jest nierealne. Dlatego, aby nie zmarnować pracy wykonanej przez Doktorantkę, oraz dobrze napisanych początkowych części rozprawy, wnoszę o poprawę i uzupełnienie rozprawy o następujące elementy:

1. zmianę tytułu,
2. podanie liczby powtórzeń eksperymentów i dodanie brakujących analiz statystycznych,
3. korektę innych wymienionych przeze mnie błędów.

z poważaniem

