



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Prof. dr hab. Szczepan Zapotoczny
Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków
tel. 12 686 2530
Email: s.zapotoczny@uj.edu.pl

RECENZJA

Wydział Chemii

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Eweliny Waglewskiej
pt.: „Projektowanie i otrzymywanie nowych bilosomów jako biozgodnej
nanoplatformy wzmacniającej terapię fito-fotodynamiczną”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Eweliny Waglewskiej została wykonana pod opieką promotorską Pani dr hab. inż. Urszuli Bazylińskiej, prof. PWr na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej i obejmuje zagadnienia związane z otrzymywaniem i badaniem nowych nośników substancji aktywnych opartych na asocjacyjnych układach koloidalnych zwanych bilosomami.

Jest to aktualna tematyka badawcza rozwijana w zespole pani profesor Urszuli Bazylińskiej, która jest odpowiedzią na potrzebę enkapsulowania i efektywnego dostarczania leków, zarówno tych o charakterze lipofilowym, jak i hydrofilowym w odpowiednich nanonośnikach. Pomimo dostępności szerokiej gamy nanonośników do zastosowań biomedycznych, takie, które umożliwiałyby równoczesną enkapsulację leków lipofilowych i hydrofilowych są wciąż bardzo pożądane. Zastosowanie tego typu układów do wzmocnionej terapii fotodynamicznej, czy też transdermalnego dostarczania substancji biologicznie czynnych, jest ważnym problemem badawczym, który zdecydowała się rozwiązywać Doktorantka, czego dowodem jest niniejsza rozprawa.

Recenzowana praca doktorska oparta jest na 7 monotematycznych publikacjach Doktorantki, opublikowanych w latach 2020-2025, przy czym jedna z prac (P1) jest pracą przeglądową, a pozostałe są eksperymentalne. We wszystkich pracach eksperymentalnych Doktorantka jest pierwszym autorem, co świadczy o Jej bardzo znaczącym udziale w ich przygotowaniu, adekwatnym do roli osoby przygotowującej pracę doktorską, co potwierdzone jest także w załączonych oświadczeniach. Cała rozprawa, oprócz załączonych publikacji zawiera wstęp literaturowy oraz autoreferat obejmujący opis nie tylko uzyskanych wyników badawczych, ale także, wykorzystaną metodologię badawczą. Publikacje zostały wydane w dobrych i bardzo dobrych czasopismach specjalistycznych, których łączny „impact factor” przekracza 35 (>5 na publikację).

W krótkim wprowadzeniu Doktorantka przedstawiła zagadnienia związane ze strukturami pęcherzykowymi takimi jak liposomy oraz kolejne generacje takich układów aż do tytułowych bilosomów, a także ich aktualne zastosowania jako nośniki leków. W ramach przeglądu literaturowego opisała układy do transdermalnego dostarczania leków, w tym potencjał takich układów wykorzystujących bilosomy, które dzięki zawartości kwasów żółciowych są bardziej stabilne od klasycznych liposomów i lepiej nadają się do aplikacji transdermalnych. Te biosurfaktanty nie tylko stabilizują strukturę pęcherzykową, ale także przyczyniają się do wzrostu przepuszczalności błony i zdolności penetracyjnych tych pęcherzyków przez skórę. W dalszej części przeglądu wprowadzone zostało także pojęcie terapii fotodynamicznej oraz nowej jej odmiany tj. terapii fito-fotodynamicznej. Przegląd też wskazuje na braki w literaturze doniesień dotyczących m.in. wykorzystania pęcherzyków bilosomalnych jako nośników fotouczulaczy i innych aspektów, które wskazują na motywację do podjęcia badań zawartych w tej rozprawie. Bardzo dobrym uzupełnieniem tego wprowadzenia literaturowego jest pierwsza publikacja z cyklu (P1), która jest przeglądem w tematyce efektywnego dostarczania fotoaktywnych substancji w nanonośnikach z materii miękkiej, z wątkami poświęconymi nośnikom liposomalnym oraz transdermalnym dostarczaniu składników aktywnych.

Prowadzi to czytelnika do przedstawionego zasadniczego celu rozprawy doktorskiej jakim było opracowanie powtarzalnej metody wytwarzania nowych nanonośników lipidowo-polimerowych typu modyfikowanych układów pęcherzykowych (tzw. bilosomów nowej generacji), przeznaczonych do ko-enkapsulacji związków aktywnych o zróżnicowanej

rozpuszczalności w wodzie oraz zastosowanie tych układów do nowej terapii fito-fotodynamicznej (ang. *phytophotodynamic therapy*, fito-PDT). Takie układy hybrydowe miałyby łączyć działanie konwencjonalnego fotouczulacza ze związkiem pochodzenia roślinnego o właściwościach ochronnych i/lub przeciwdrobnoustrojowych. Wraz z celem pracy zostały skrótowo opisane także etapy badawcze, które stanowią dobre podsumowanie całego planu badawczego.

Kolejny rozdział obejmuje przedstawienie metodyki prac badawczych. Liczba technik wykorzystanych do charakterystyki wytworzonych bilosomów jest szczególnie duża obejmując, oprócz metod opartych na rozpraszaniu światła (DLS, ELS, MLS), także metody spektroskopowe (UV-Vis, ATR-FTIR) i mikroskopowe (fluorescencyjna mikroskopia konfokalna, AFM, TEM). W toku dalszych badań wykorzystywane były liczne procedury związane z hodowlą komórkową i oceną żywotności komórek, aktywności przeciwnowotworowej i przeciwdrobnoustrojowej badanych układów, ich zdolności do (foto)generowania tlenu singletowego, czy też zastosowanie innowacyjnej mikroskopii holotomograficznej.

Część stanowiąca przewodnik po wynikach uzyskanych i zaprezentowanych w publikacjach w ramach pracy doktorskiej jest napisana przejrzysto i podsumowuje nie tylko osiągnięcia pracy, ale wskazuje także na uzasadnienie etapów osiągania głównego celu dysertacji. Bardzo klarowne zestawienie zarówno zróżnicowanego składu, ładunku powierzchniowego, jak też substancji aktywnych używanych przez Doktorantkę w 6 pracach eksperymentalnych zostało zaprezentowane w Tabeli 3, z przypisaniem poszczególnych układów do publikacji zawartych w cyklu.

Kluczowym aspektem pierwszego etapu badań był precyzyjny dobór substratów odpowiedzialnych za tworzenie otoczki nośnika, jak również optymalizacja warunków procesowych, ukierunkowana na otrzymanie nanostruktur nowej generacji o ściśle określonych parametrach fizykochemicznych. Zakres prowadzonych badań obejmował opracowanie dwóch typów struktur pęcherzykowych, zmodyfikowanych bilosomów, różniących się składem dwuwarstwy fosfolipidowej, co determinowało ich ładunek powierzchniowy. Podstawę kompozycji analizowanych układów stanowił biodegradowalny surfaktant, tj. fosfatydylocholina pochodząca z żółtka jaja kurzego, która charakteryzująca się biokompatybilnością względem skóry ludzkiej, oraz sól kwasu żółciowego w postaci

cholenu sodu. Ponadto zastosowano dodatkowe pokrycia polimerowe – kopolimer Pluronic®P123 dla ujemnie naładowanych struktur i pochodną PEG dla kationowych układów, których celem było zwiększenie stabilności otrzymanych bilosomów. We wszystkich pracach (P2-P7), zoptymalizowane warunki otrzymywania załadowanych bilosomów doprowadziły do otrzymania sferycznych struktur o rozmiarze ok. 100 nm (DLS i TEM) oraz uzyskano wysoki stopień (ko)enkapsulacji związków aktywnych, zarówno fotouczulaczy (>80%; błękit metylenowy, róż bengalski), jak też stosowanych fitozwiązków (>90%; kurkumina, astaksantyna, olej rokitnikowy).

W dalszej kolejności udało się Doktorantce potwierdzić, że zastosowanie tych nowych nanonośników nie tylko umożliwia koenkapsulację substancji różniących się znacząco hydrofilowością, ale stanowią one efektywną ochronę enkapsulowanych związków przed procesem opsonizacji (ważne dla zastosowań biomedycznych) oraz pozwalają ograniczyć skutki fotowysielania fotouczulaczy, które zwykle powodujące utratę ich aktywności fotodynamicznej. Wykazała również aktywność antyrodnoustrojową oraz antynowotworową wybranych układów przy ograniczonym negatywnym wpływie na komórki normalne w warunkach in vitro. Łącznie wskazuje to na wysoki potencjał aplikacyjny nowych bilosomów w zakresie przeciwbakteryjnego, a w szczególności przeciwnowotworowego działania w zakresie terapii fito-fotodynamicznej.

Załączone eksperymentalne publikacje naukowe (P2-P7) poprzez wytworzenie i zbadanie nowych nanonośników realizują postawiony cel pracy doktorskiej. Zostały napisane w sposób przejrzysty, z podaniem niezbędnych informacji umożliwiających odtworzenie raportowanych wyników. Wyciągnięte w poszczególnych publikacjach wnioski badawcze zostały dobrze poparte przez załączone wyniki badań wykonane z wykorzystaniem licznych i nowoczesnych technik badawczych.

Poza moją ogólną bardzo pozytywną oceną osiągnięć przedstawionych w dysertacji chciałbym się odnieść do pracy także w postaci kilku polemicznych komentarzy i pytań:

(1) Jak można wytłumaczyć różnice w efektywności enkapsulacji stosowanych fotouczulaczy oraz pozostałych związków? W szczególności chodzi o różnicę wartości pomiędzy publikacjami P2 i P3 gdzie zastosowano te same substancje enkapsulowane.

Czy metodologia wyznaczania tej efektywności uwzględniała rozpuszczalność danego związku enkapsulowanego w wodzie, różnice w wartościach log P?

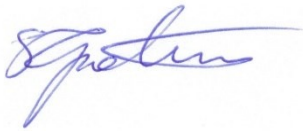
(2) Czy obrazowanie metodą kriogenicznego TEM było wykonywane dla bilosomów? Jakich różnic pomiędzy wynikami TEM, a cryo-TEM można się spodziewać?

(3) Proszę przedyskutować mechanizm stabilizacji bilosomów przez stosowane dodatki polimerowe. Jaka jest lokalizacja, na poziomie molekularnym szczególnie makrocząsteczek Pluronic®P123?

(4) W publikacji P5 wykazano ochronny charakter kurkuminy względem błękitu metylenowego skutkujący efektywniejszym fotogenerowaniem tlenu singletowego w układzie. Czy wiadomo jaki jest mechanizm tego działania i jakie są pożądane właściwości związku chemicznego, który może odgrywać taką rolę.

W podsumowaniu mogę stwierdzić, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki prac badawczych mają istotne znaczenie dla rozwoju nanośników leków w postaci nowych układów pęcherzykowych do równoczesnego przenoszenia aktywnych substancji lipofilowych i hydrofilowych. Pani mgr inż. Ewelina Waglewska wykazała się umiejętnością prowadzenia pracy badawczej na wysokim poziomie, w interdyscyplinarnej tematyce badawczej oraz właściwej interpretacji wyników uzyskanych z szeregu zaawansowanych metod badawczych i wyciągania rzetelnych wniosków na ich podstawie. Wykazała swoje umiejętności zarówno w zakresie projektowania i otrzymywania nowych układów koloidalnych, ich szczegółowej charakterystyki fizykochemicznej, ale także zastosowania badań fotofizycznych i fotochemicznych oraz biologicznych. Praca ma charakter wybitnie interdyscyplinarny lokując się na pograniczu fizykochemii układów koloidalnych, i biotechnologii z elementami fotochemii, co było niezbędne do osiągnięcia ambitnych, założonych celów badawczych. Na podkreślenie zasługuje ponadprzeciętny dorobek publikacyjny Pani mgr inż. Eweliny Waglewskiej (9 publikacji, 1 rozdział w monografii, 1 zgłoszenie patentowe) oraz aktywność w prezentacji wyników badawczych (11 konferencji krajowych i zagranicznych, 2 nagrodzone prezentacje). Oceniając pozytywnie recenzowaną

pracę stwierdzam, że spełnia ona wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” - tekst jednolity: DzU z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.). Wnoszę, zatem do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Eweliny Waglewskiej do obrony pracy doktorskiej. Ponadto, doceniając ważność i wartość Jej osiągnięć badawczych w zakresie nowych nanonośników leków, szeroki warsztat badawczy oraz jakość publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr inż. Eweliny Waglewskiej.



Szczepan Zapotoczny