

Dr hab. inż. Joanna Chwiej, prof. uczelni  
Joanna.Chwiej@fis.agh.edu.pl  
Zespół Biospektroskopii Atomowej i Molekularnej  
Katedra Fizyki Medycznej i Biofizyki

Kraków dn., 15.11.2021

## Opinia o pracy doktorskiej

***„Characterization and synthesis of drug carriers based on artificial exosomes dedicated to treatment of the microangiopathic complications of diabetes”***

**Pani mgr Anny Drożdż**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Anny Drożdż została przygotowana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n. med. Ewy Łucji Stępień na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego. Praca dotyczy opracowania nowatorskiego systemu dostarczania leków bazującego na sztucznych egzosomach, uzyskanych w procesie fuzji liposomów i pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, który mógłby zostać wykorzystany w leczeniu mikronaczyniowych powikłań cukrzycy.

Hiperglikemia występująca w przebiegu cukrzycy typu 1 i typu 2 jest odpowiedzialna za szereg powikłań, przy czym powikłania naczyniowe stanowią główną przyczynę zachorowalności i śmiertelności cierpiących na cukrzycę pacjentów. Przyspieszona przebudowa i miażdżyca tętnic, dysfunkcja komórek śródbłonna, wpływa na układ zarówno makro-, jak i mikrokrążenia, prowadząc do postępującego niedokrwienia tkanek i hipoksji. W przeciwieństwie do makroangiopatii, której można łatwiej zapobiegać przy użyciu dostępnych obecnie środków farmakologicznych, leczenie mikroangiopatii prowadzącej do uszkodzeń wzroku, nerek czy włókien nerwowych, jest znacznie bardziej problematyczne i stanowi ogromne wyzwanie współczesnej medycyny. Dlatego też uważam podjęty przez Doktorantkę temat za ogromnie ważny i aktualny.

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Drożdż została napisana w języku angielskim. Liczy 108 stron i podzielona została na 6 głównych części (Tło teoretyczne, Cele rozprawy, Metodologia, Wyniki, Dyskusja i Wnioski). Dodatkowo, poprzedzają ją streszczenia w języku angielskim i polskim oraz listy

**Akademia Górniczo-Hutnicza | Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej  
Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej**

Al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków  
tel: +48 12 617 2951, +48 12 633 3740, fax: +48 12 634 0010  
e-mail: fizagh@ftj.agh.edu.pl, www.fis.agh.edu.pl



publikacji i wystąpień konferencyjnych Doktorantki. Na końcu pracy znajduje się także lista rysunków, lista tabel oraz spis cytowanej w rozprawie literatury.

W rozdziale 1. Autorka naświetla motywację, jaka skłoniła ją do podjęcia badań oraz przedstawia bieżący stan wiedzy w zakresie podjętego tematu, do czego wykorzystuje dobrze dobrane i aktualne pozycje literaturowe. Ogólny cel pracy, jak również jej cele szczegółowe zostały w rozprawie jasno sformułowane i zamieszczone w rozdziale 2. Część 3. rozprawy, zatytułowana Metodologia, zawiera informacje dotyczące syntezy sztucznych egzosomów, metod służących do monitorowania fuzji liposomów i pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz badania własności fizycznych i biologicznych wejściowych i wyjściowych struktur biologicznych. Opis wyników uzyskanych w ramach rozprawy autorka zamieszcza w rozdziale 4, a ich dyskusję w 5. części pracy. Rozprawę kończy krótkie podsumowanie zawierające główne wnioski płynące z przeprowadzonych badań. W opinii recenzenta zaproponowany przez Doktorantkę układ rozprawy jest bardzo dobry.

Jak wspomniano na wstępie, praca Pani Drożdż koncentruje się na opracowaniu i scharakteryzowaniu własności fizycznych i biologicznych nowatorskiego systemu dostarczania leków opartego na sztucznych egzosomach, który można byłoby wykorzystać w terapii mikronaczyniowych powikłań cukrzycy. Doktorantka przeprowadza w pracy syntezę sztucznych egzosomów wykorzystując do tego celu fuzję pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wyizolowanych z medium hodowlanego komórek HUVEC oraz trzech rodzajów liposomów – zawierających fosfatydylocholinę (DOPC), fosfatydyloserynę (PS) oraz sfingomielinę (SM). Przy użyciu techniki FRET (*ang.* Förster Resonance Energy Transfer) weryfikuje, czy proces fuzji przebiegł z sukcesem oraz optymalizuje protokół przygotowania nośników. Uzyskane sztuczne egzosomy charakteryzuje pod kątem zarówno własności fizycznych (morfologia, potencjał zeta, wielkość i stężenie), jak i biologicznych, badając w nich obecność markerów charakterystycznych dla pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, oceniając ich cytotoksyczność czy zdolność internalizacji. Dodatkowo Pani Drożdż przeprowadza szereg testów czynnościowych na śródbłonkowym modelu cukrzycy, których celem jest zweryfikowanie, czy wytworzone nośniki korzystnie wpływają na ekspresję mRNA dla TIMP-3, aktywność metaloproteinaz i migrację komórek śródbłonka sprzyjającą procesom gojenia ran.

Wszystkie narzędzia badawcze, jakie doktorantka wykorzystwała w pracy do śledzenia procesu wytwarzania sztucznych egzosomów, charakterystyki ich własności fizycznych, biologicznych i funkcjonalnych zostały poprawnie dobrane i zastosowane. Uzyskane w ramach rozprawy bardzo ciekawe i obiecujące wyniki zostały przez Doktorantkę przedyskutowane i skonfrontowane z aktualnym stanem wiedzy prezentowanym w najświeższej literaturze naukowej.

Rolą moja jako recenzenta jest także zwrócenie uwagi na niedociągnięcia czy uchybienia, jakie pojawiają się w pracy. Celem ich przedstawienia nie jest wytykanie niedoskonałości rozprawy, a raczej skłonienie do refleksji i motywacja

do dalszego doskonalenia się. Uwagi te, które w żadnej mierze nie umniejszają mojej wysokiej ocenie pracy, przedstawiam poniżej.

*Uwaga 1:*

Nie jest dla mnie do końca jasne, jakimi przesłankami kierowano się przy wyborze zastosowanego w pracy modelu komórkowego, czyli pierwotnej linii śródbłonna naczyń izolowanej z żyły pępowinowej HUVEC.

*Uwaga 2:*

Bardzo oszczędnie w pracy opisano sposób wyznaczania żywotności i cytotoksyczności w oparciu o komercyjnie dostępny test ApoTox-Glow Triplex Assay. Jest to o tyle ważne, że nie jest on tak powszechnie stosowany jak np. test MTT czy ten wykorzystujący błękit trypanu.

*Uwaga 3:*

W części 2.5 (powinno być 3.5) Autorka listuje grupy badawcze, które parami będzie porównywała pod kątem uzyskanych rezultatów w dalszej części pracy. Choć większość par nie budzi najmniejszych wątpliwości, to zastanawia mnie, jakie wnioski miałyby płynąć z porównania grup HG+aEx oraz NG+EVs.

*Uwaga 4:*

Wyniki badań FRET uzyskane dla liposomów zawierających fosfatydylocholinę (DOPC) i fosfatydyloserynę (PS) potwierdzają zajście fuzji, odpowiednio, przy obu badanych stosunkach lipidów do białek lub tylko przy wyższym z nich. Ale również dla liposomów zawierających sfingomielinę (SM) obserwuje się równoczesny wzrost pasma przy ok. 530 i spadek przy 580 nm dla stosunku lipidów do białek wynoszącego 1:8, o czym zapomina Autorka.

*Uwaga 5:*

Wyniki pomiarów potencjału zeta uzyskane dla sztucznych egzosomów powstałych z fuzji liposomów zawierających fosfatydyloserynę i zamieszczone na rysunku 12C jednoznacznie wskazują na obecność w badanym roztworze trzech frakcji różniących się badanym parametrem. Co taki wynik może oznaczać? Czy uprawnione jest zamieszczanie jako ostatecznej wartości potencjału zeta (Tabela 6) dla tych sztucznych egzosomów tylko wartości uzyskanej dla frakcji o największym udziale?

*Uwaga 6:*

Podobna uwaga dotyczy wyników pomiarów rozkładu wielkości badanych struktur biologicznych. Rozkłady wielkości (Rysunek 13) uzyskane zarówno dla pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, jak i sztucznych egzosomów mają charakter wielomodalny, czy zatem na pewno uprawnione jest w tym wypadku stosowanie średniej jako miary wartości oczekiwanej ich rozmiaru?

Dlaczego mimo, że zamieszczone w Tabeli 7 parametry dla pęcherzyków zewnątrzkomórkowych są identyczne dla wszystkich liposomów, to rozkład wielkości zaprezentowany w części A na Rysunku 13 istotnie się różni od tych z części B i C?

*Uwaga 7:*

W rozdziale 4.2.5 Doktorantka porównuje pęcherzyki zewnątrzkomórkowe dekorowane białkiem Del-1 ze sztucznymi egzosomami dekorowanymi tym samym białkiem, żeby określić skuteczność przeprowadzonej operacji. Czy nie powinna raczej porównywać wyników western blot dla sztucznych egzosomów dekorowanych i niedekorowanych Del-1?

*Uwaga 8:*

Zaprezentowane na Rysunku 17 (rozdział 4.3.1) różnice w aktywności kaspazy wydają się być znacznie większe niż zmierzone dla komórek różnice w żywotności i cytotoksyczności. Również rozrzut tego parametru jest bardzo mały, więc może dziwić fakt, że obserwowane między populacjami komórek różnice nie są istotne statystycznie.

*Uwaga 9:*

Oceniając cytotoksyczność pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i sztucznych egzosomów w warunkach hiperglikemii (str. 67-68) zastosowano normalizację do warunków ekspozycji na pęcherzyki zewnątrzkomórkowe w warunkach normoglikemii, dlaczego? Czy nie powinno się tu raczej zastosować normalizacji do warunków, w których komórki poddane są hiperglikemii, ale bez ekspozycji na badane struktury biologiczne?

*Uwaga 10:*

Część pracy, w której zaprezentowano wyniki testu gojenia ran zyskałaby bardzo na wartości, gdyby zamieścić w niej fotografie dla warunków początkowych eksperymentu.

*Inne drobne uwagi techniczno-edytorskie, które nie będą dyskutowane podczas publicznej obrony:*

1. Praca została przygotowana dość starannie pod względem edytorskim i estetycznym, choć wielkość rysunków, rozmiar czcionek na rysunkach i w tabelach powoduje, że nie zawsze są one w pełni czytelne.
2. Mimo, że język angielski nie jest moim językiem ojczystym, a głównie narzędziem w pracy naukowej, zauważyłam w rozprawie (nie bardzo liczne) błędy literowe i gramatyczne.
3. W pracy przytaczane są informacje, definicje, równania, które mimo, że nieoczywiste, nie są poparte właściwymi odniesieniami do literatury.
4. W wielu miejscach pracy znaleźć można błędne przekierowania do informacji, rysunków czy tabel (np. na str. 52, II akapit, powinno być równanie 4 w części 3.2 – jest w części 2.2; ostatni akapit na tej samej stronie, powinno być krzywa kalibracji opisana w części 3.2 – jest 2.2).
5. Zaznaczone na rysunku 14B i C dla pęcherzyków zewnątrzkomórkowych niepewności nie są spójne z danymi zamieszczonymi w tabelce na tym samym rysunku.

*Podsumowanie:*

Niezależnie od przedstawionych powyżej uwag, zamieszczone w pracy doktorskiej Pani mgr Anny Drożdż rezultaty uważam za bardzo cenne. Wskazują one na dużą wiedzę Doktorantki w zakresie realizowanego tematu, dobre

przygotowanie w zakresie stosowanych metod eksperymentalnych, a także predyspozycje do pracy w interdyscyplinarnym zespole, w tym również w charakterze lidera. Należy podkreślić bowiem, że przedstawione w rozprawie rezultaty zostały uzyskane w ramach projektu NCN Preludium 13 pt. „Charakterystyka i synteza nośników leków opartych na sztucznych egzosomach skierowanych do leczenia powikłań mikronaczyniowych w cukrzycy”, którym Pani mgr Anna Drożdż kierowała oraz czterech dotacji celowych przeznaczonych na finansowanie zadań służących finansowaniu badań młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ. W okresie realizacji pracy doktorskiej, Doktorantka była współautorem 10 artykułów opublikowanych w dobrych i bardzo dobrych czasopismach z listy filadelfijskiej. Przy czym pierwszym autorem była w dwóch spośród wspomnianych publikacji. Pani Drożdż wykazała się zatem nie tylko umiejętnością skutecznego prowadzenia pracy naukowej, ale z sukcesem zdobywała środki na realizowane w ramach doktoratu badania i badaniami tymi efektywnie kierowała.

Praca doktorska Pani mgr Anny Drożdż stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki do stopnia doktora w dyscyplinie nauki fizyczne. Dlatego, stwierdzam, że rozprawa spełnia wszystkie zwyczajowe i formalne wymogi stawiane rozprawom doktorskim w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie o dopuszczenie Doktorantki do publicznej obrony pracy doktorskiej oraz dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Handwritten signature in blue ink, reading "Joanna Chmiej".

