



Toruń, 21 lutego 2025 r.

dr hab. Justyna Kozłowska, prof. UMK
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Chemii
Zespół Funkcjonalnych Materiałów Polimerowych
justynak@umk.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

mgr inż. Darii Jaworskiej-Krych

pt. „Dynamiczne hydrożele jako nośniki hormonów i leków
przeciwnowotworowych w terapii ginekologicznej”

Promotor: dr hab. Monika Gosecka, prof. CBMiM PAN

Promotor: prof. dr hab. inż. Marcin Kozanecki (Politechnika Łódzka)

Recenzja została wykonana na zlecenie Rady Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi z dnia 09.12.2024 r.

Rozprawa doktorska mgr inż. Darii Jaworskiej-Krych pt. "*Dynamiczne hydrożele jako nośniki hormonów i leków przeciwnowotworowych w terapii ginekologicznej*" koncentruje się na opracowaniu nowoczesnych hydrożeli polimerowych jako systemów dostarczania leków stosowanych w leczeniu schorzeń ginekologicznych.

Leki dopochwowe, stosowane głównie w terapii infekcji, zaburzeń hormonalnych i nowotworów ginekologicznych, mają wiele zalet, takich jak omijanie efektu pierwszego przejścia w wątrobie oraz lokalne działanie, które ogranicza skutki uboczne. Jednak pomimo tych korzyści, współczesna farmakoterapia dopochwowa boryka się z wieloma problemami, które ograniczają skuteczność terapii i komfort pacjentek. Jednym z kluczowych problemów jest niska biodostępność substancji czynnych, wynikająca z ich słabej rozpuszczalności w wodzie. Ponadto, szybka eliminacja leku przez naturalne procesy fizjologiczne pochwy powoduje konieczność częstego dawkowania, co może być uciążliwe dla pacjentek. Istniejące formułacje, takie jak globulki, kremy czy tabletki dopochwowe, często nie zapewniają kontrolowanego uwalniania leku, co prowadzi do nagłych skoków stężenia substancji aktywnej, a następnie jej szybkiego spadku, ograniczając skuteczność terapii. Wyciek preparatu po aplikacji dodatkowo zmniejsza jego czas działania i może powodować dyskomfort. Istotnym problemem jest również oporność drobnoustrojów, szczególnie w kontekście zakażeń grzybiczych wywoływanych przez *Candida albicans* i *Candida glabrata*, które mają tendencję do nawrotów, co utrudnia skuteczne leczenie infekcji. Ponadto, brakuje innowacyjnych systemów dostarczania leków przeciwnowotworowych, które mogłyby działać miejscowo, minimalizując skutki uboczne terapii ogólnoustrojowej. Wszystkie te czynniki wskazują na pilną potrzebę opracowania nowoczesnych nośników leków, które zapewnią lepszą skuteczność, dłuższe działanie i większy komfort stosowania.

Tematyka przedstawionej do recenzji rozprawy jest z całą pewnością ważna i aktualna, a także wpisuje się we współczesny nurt badań realizowanych w wiodących jednostkach naukowych. Doktorantka podjęła się zaprojektowania nowoczesnych systemów dostarczania leków, oferując alternatywę dla konwencjonalnych formułacji



farmaceutycznych stosowanych waginalnie, które często mają ograniczoną skuteczność. Praca dotyczy hydrofobizowanych pochodnych hiperrozgałęzionego poliglicydolu (HbPGL), które zostały zaprojektowane jako nośniki dla leków trudno rozpuszczalnych w wodzie, w tym klotrimazolu (lek przeciwgrzybiczy), 5-fluorouracylu (lek przeciwnowotworowy) oraz hormonów (progesteron, estradiol). O rzeczywistej potrzebie badań w tym obszarze świadczy fakt, że Promotor uzyskał na nie finansowanie z projektu Sonata-Bis NCN.

Dysertacja doktorska składa się z cyklu trzech tematycznie powiązanych artykułów naukowych ([A1], [A2], [A3]), opublikowanych w latach 2022–2024. Wszystkie publikacje są oryginalnymi pracami badawczymi i ukazały się w czasopismach wydawnictwa American Chemical Society, takich jak *Biomacromolecules* (IF₂₀₂₂ = 6,2), *Applied Materials & Interfaces* (IF₂₀₂₃ = 8,3) oraz *Macromolecules* (IF₂₀₂₃ = 5,1). Artykuły są wieloautorskie (od 7 do 9 współautorów), a w dwóch z nich Doktorantka jest pierwszym autorem. Załączone oświadczenia współautorów potwierdzają znaczącą rolę mgr inż. Darii Jaworskiej-Krych, gdyż Jej wkład obejmował udział w dużej części prac eksperymentalnych, zwłaszcza związanych z przeprowadzeniem procesu polimeryzacji oraz modyfikacji poliglicydolu, rejestracji widm NMR, IR lub UV-Vis, enkapsulacji leku i badaniu jego uwalniania, przygotowaniu hydrofobizowanych hydrożeli i ocenie procesu samoreparacji sieci polimerowej. Dodatkowo, jako czwartą „publikację” wchodzącą w skład rozprawy, Doktorantka wykazała:

[A4] Gosecka M., Jaworska-Krych D., Gosecki M., Urbaniak M., Wielgus E., Gostynski B., Marcinkowska M., Janaszewska A., Klajnert-Maculewicz B., *Construction of dynamic hydrogel inducing effective and selective 5-fluorouracil monotherapy against cervical cancer cells, w przygotowaniu.*

Materiał badawczy wraz z wynikami analiz do publikacji o zadeklarowanym statusie „w przygotowaniu” został omówiony w rozdziale 8.4 *Badania nieopublikowane.*



Z formalnego punktu widzenia przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została zredagowana w prawidłowy i spójny sposób, w formie opracowania, którego integralną część stanowią załączone publikacje wraz z oświadczeniami wszystkich współautorów. Praca doktorska stanowi swojego rodzaju przewodnik do zagadnień i badań opublikowanych w omawianych trzech artykułach naukowych. Kompilację prac poprzedza *Streszczenie* w j. polskim i j. angielskim, *Wykaz stosowanych skrótów* oraz *Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej*. Następnie w pracy znajduje się część zatytułowana *Przegląd literatury*, która została podzielona na 4 podrozdziały: *Budowa żeńskich narządów płciowych*; *Najczęściej występujące choroby ginekologiczne*; *Leczenie chorób ginekologicznych*; *Amfifilowy hiperrozgałęziony poliglicydol jako materiał do tworzenia hydrofobizowanych hydrożeli polimerowych*.

Kolejny punkt stanowi prezentacja głównego celu badań sformułowanego jako: „...wyeliminowanie problemów rozpuszczalności leków trudno rozpuszczalnych w wodzie stosowanych w leczeniu ginekologicznym, poprzez ich enkapsulację w monomolekularnych, amfifilowych, micelach zbudowanych z hydrofobizowanego HbPGL, a następnie przygotowanie hydrożelowego nośnika do transportu i równomiernego dozowania leku wytworzonego w oparciu o wyżej wspomniane micelle związane dynamicznymi węzłami sieci.” Hipoteza badawcza, cel pracy oraz etapy zaplanowane do realizacji celu zostały przedstawione w sposób szczegółowy i przejrzysty.

W oddzielnym rozdziale Doktorantka zestawiała i scharakteryzowała stosowaną metodykę badań. W części zatytułowanej *Wyniki własne* znalazły się dość obszerne streszczenia trzech opublikowanych artykułów wraz z wnioskami. Kolejny rozdział zawiera *Badania nieopublikowane* i składa się z dwóch podrozdziałów: *Amfifilowy hiperrozgałęziony poliglicydol w terapii przeciwnowotworowej*; *Zwiększenie rozpuszczalności hormonów*.

Całość pracy uzupełniają *Podsumowanie i wnioski* oraz *Wykaz cytowanej literatury*, liczący 84 pozycje, na podstawie której Doktorantka nakreśliła istotność podjętej tematyki badawczej. W kolejnych rozdziałach scharakteryzowano *Życiorys naukowy*

Doktorantki uwzględniając m.in. Jej udział w konferencjach naukowych, szkoleniach, projektach naukowych, a także otrzymane nagrody i inne aktywności naukowe. Ostatni z rozdziałów to wspomniane wcześniej załączone publikacje wraz z oświadczeniami współautorów.

Zasadnicza część dysertacji opiera się na trzech opublikowanych artykułach, a także wynikach nieopublikowanych, które stanowią podstawę do przygotowania kolejnego artykułu. Praca **A1** koncentruje się na hydrofobizowanych hydrożelach jako nośnikach leków słabo rozpuszczalnych w wodzie. Badania obejmowały syntezę i charakterystykę nowych amfifilowych polimerów na bazie hiperrozgałęzionego HbPGL oraz ocenę ich zdolności do enkapsulacji i kontrolowanego uwalniania klotrimazolu. Doktorantka wykazała, że otrzymane hydrożele skutecznie enkapsulują i kontrolują uwalnianie hydrofobowego leku. W wyniku przeprowadzonych badań wyłoniła optymalną strukturę hydrożelu, charakteryzującą się parametrami odpowiednimi do dozowania w miejsce chorobowo zmienione na drodze wstrzyknięcia, a także zdolnością do samonaprawy.

W pracy **A2** Doktorantka opracowała metodę enkapsulacji modelowego leku hydrofobowego – klotrimazolu – w strukturze HbPGL o znacznym stopniu hydrofobizacji grupami fenyłowymi, co zwiększyło rozpuszczalność leku aż 127 000 razy. Materiały wykonane z hydrofobizowanego HbPGL z ugrupowaniami bifenyłowymi były stabilniejsze niż materiały na bazie fenyłowych pochodnych, a ich właściwości reologiczne zapewniały utrzymanie nośnika leku w pochwie. Badania wykazały również, że zastosowanie matrycy polimerowej zwiększało przenikalność klotrimazolu przez błony biologiczne oraz wydłużało czas jego działania do 7 dni, co pozwala na rzadsze aplikacje i skuteczniejszą terapię przeciwgrzybiczą.

Najważniejszym osiągnięciem pracy **A3** było poznanie mechanizmów termowrażliwości hydrofobizowanych przy użyciu grup fenyłowych hioperrozgałęzionych poliglicydoli. Symulacje komputerowe oraz badania



spektroskopowe dostarczyły nowych informacji o zachowaniu tych polimerów, co może stanowić podstawę do syntezy podobnych układów.

Wyniki uzyskane podczas realizacji badań zostały już opublikowane w trzech wyżej wymienionych artykułach w prestiżowych czasopismach naukowych, gdzie przeszły proces recenzji i zostały poddane krytycznej analizie przez ekspertów w danej dziedzinie.

W rozdziale 8.4 zakres badań nad hydrożelami HbPGL został rozszerzony o ich potencjalne zastosowanie jako nośników leków przeciwnowotworowych i hormonów w terapii ginekologicznej. W podrozdziale 8.4.1 przedstawiono wyniki badań HbPGL pod kątem zastosowania w terapii przeciwnowotworowej, ze szczególnym uwzględnieniem miejscowego dostarczania 5-fluorouracylu w leczeniu raka szyjki macicy. Badania opisane w tej części stanowią materiał do powstającej publikacji **A4**. Do realizacji celu badań wykorzystano hiperrozgałęziony poliglicydol o wnętrzu modyfikowanym ugrupowaniami hydrofobowymi przy użyciu estrów benzoilowych, grup fenylouretanowych oraz bifenylouretanowych. Przeprowadzając stosowne analizy Doktorantka dowiodła, że zastosowanie matrycy hydrożelowej na bazie hydrofobizowanego HbPGL wzmocniło działanie leku przeciwnowotworowego (5-fluorouracylu). Dynamiczne hydrożele wytworzone na bazie pochodnych fenylouretanowych i bifenylouretanowych wykazały efekt terapeutyczny już po 24 godzinach, przy jednoczesnym zachowaniu selektywności wobec komórek raka szyjki macicy, co oznaczało eliminację komórek nowotworowych przy minimalnym wpływie na zdrowe tkanki. Opracowanie selektywnego nośnika leku przeciwnowotworowego, działającego bezpośrednio w miejscu zmienionym chorobowo, to kluczowe osiągnięcie badań, które może znacząco zwiększyć skuteczność dopochwowych terapii onkologicznych oraz poprawić komfort życia pacjentek. Zdaniem Recenzentki, uzyskane wyniki badań z pewnością zostaną opublikowane w czasopiśmie o wysokiej renomie.



Nieopublikowane badania obejmują także próbę opracowania nośnika estradiolu i progesteronu do zastosowania w terapii hormonalnej. Celem opracowanego nośnika jest zwiększenie rozpuszczalności hormonów w wodzie, co pozwoliłoby na poprawę ich biodostępności, a tym samym zmniejszenie liczby stosowanych dawek, przyczyniając się do zwiększenia komfortu życia kobiet z zaburzeniami hormonalnymi. W podsumowaniu tej części badań Doktorantka podkreśliła, że opracowane formułacje wymagają dalszej optymalizacji. Włączenie hormonów do struktury HbPGL osłabiło zdolność hydrożelu do samonaprawy, jednocześnie prowadząc do powstania cieczy o zwiększonej lepkości. Dodatkowo, obecność klotrimazolu w wodnych roztworach hormonów poprawiła ich przenikalność przez membranę.

Pod względem formalnym rozprawa została napisana w sposób klarowny i poprawny językowo, a jej staranna edycja zapewnia wysoką przejrzystość i spójność treści. Wśród błędów językowych Recenzentka zauważyła częste użycie niepoprawnego określenia „przeciwgrzybiczne” zamiast właściwych form „przeciwgrzybicze” lub „przeciwgrzybowe”. Inne błędy językowe występują sporadycznie, np. na stronie 19 w sformułowaniu „na zachowanie termowrażliweogromny” czy też na str. 26: „wykonano badania z wykorzystaniem spektroskopii podczerwieni”. Błędy edycyjne obejmują fragmenty, w których pozostawiono ślady zmian dokonanych w trybie „śledź zmiany”, co sugeruje, że nie zostały one ostatecznie zaakceptowane lub poprawione przed finalną edycją tekstu (np. str. 27: „1.1.1.7.2.5”; str. 28; str. 32; str. 84; str. 97). Pragnę podkreślić, że wymienione wyżej uwagi mają drugorzędne znaczenie, nie obniżają wartości merytorycznej pracy i w żadnej mierze nie wpływają na moją wysoką ocenę rozprawy doktorskiej.



W trakcie lektury dysertacji nasunęło się kilka pytań i kwestii do przedyskutowania lub wyjaśnienia podczas obrony rozprawy doktorskiej:

- ✓ Dlaczego w tytule rozprawy pominięto możliwość zastosowania opracowanych hydrożeli jako nośników leków przeciwgrzybiczych w terapii ginekologicznej? Na stronie 7 Doktorantka wskazuje: *„Celem niniejszej pracy było opracowanie materiału polimerowego, który będzie uniwersalną bazą do przygotowania efektywnych formułacji do zastosowań w dopochwowych terapiach ginekologicznych o charakterze hormonalnym, przeciwgrzybiczym czy przeciwnowotworowym”*, a jednocześnie prowadzi badania *in vitro* nad aktywnością przeciwgrzybiczą wybranych układów.
- ✓ Co skłoniło Doktorantkę do wyboru hiperrozgałęzionego poliglicydotu jako nośnika? Czy analizowano również możliwość zastosowania innych polimerów?
- ✓ Czy porównywano właściwości hydrożelu przed uszkodzeniem i po procesie samoregeneracji? Jeśli tak, jakie parametry zostały ocenione i jak się zmieniły? [A1]
- ✓ Proszę scharakteryzować roztwór symulujący płyn waginalny stosowany w badaniach. W pracy nie podano jego dokładnego składu. [A2]
- ✓ Czy opracowane systemy hydrożelowe można dostosować do innych grup leków stosowanych w terapii ginekologicznej?
- ✓ Jakie są kierunki dalszych badań będących kontynuacją pracy doktorskiej? Czy planowane są badania kliniczne? Jeśli tak, to jakie mogą być potencjalne ograniczenia wprowadzenia tych hydrożeli do praktyki klinicznej?
- ✓ Który z opracowanych nośników, zdaniem Doktorantki, wykazuje największy potencjał aplikacyjny?

Pragnę dodać, że te pytania wynikają jedynie z zaciekawienia tematem, a ich rozwinięcie i przedyskutowanie w trakcie obrony pozwoli na dokładniejsze zrozumienie podejmowanych badań.



Wnioski końcowe

Problem badawczy przedstawiony w recenzowanej pracy doktorskiej został jasno i precyzyjnie sformułowany oraz poparty najnowszymi doniesieniami literaturowymi. W opinii Recenzentki na szczególne uznanie zasługuje zarówno liczba, jak i różnorodność metod badawczych zastosowanych przez Doktorantkę w trakcie realizacji badań, co nadaje pracy charakter interdyscyplinarny. Cele eksperymentalne wymagały szeroko zakrojonych badań obejmujących:

- ✓ metody fizykochemiczne, takie jak spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego i spektroskopia Ramana,
- ✓ metody farmaceutyczne, w tym badania biodostępności leków w nowo opracowanych nośnikach,
- ✓ metody biologiczne, takie jak testy cytotoksyczności na liniach komórkowych (HeLa i HMEC-1),

dodatkowo wspierane symulacjami komputerowymi. Z materiału zawartego w rozprawie wynika, że prace prowadzone były konsekwentnie i obejmowały wiele etapów, a zgromadzenie bogatego materiału doświadczalnego wymagało dużego nakładu pracy.

Przeprowadzone i opisane w dysertacji badania stanowią istotny wkład w rozwój nowoczesnych systemów dostarczania leków w ginekologii i mogą znaleźć zastosowanie w przyszłych terapiach opartych na hydrożelach. Praca wnosi elementy nowości, a opracowane systemy mają potencjał kliniczny, oferując wydłużone działanie leku oraz większy komfort dla pacjentek.

Przygotowując opinię o rozprawie doktorskiej, należy również podkreślić całokształt dokonań naukowych Doktorantki, który obejmuje szeroki wachlarz aktywności naukowych i świadczy o jej wyjątkowym zaangażowaniu w rozwój nauki.



Podsumowując, badania naukowe przeprowadzone przez Panią mgr inż. Darię Jaworską-Krych charakteryzuje duża wartość poznawcza oraz aplikacyjna. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wnosi istotny wkład w rozwój badań skoncentrowanych na opracowaniu nowych i skutecznych terapii chorób ginekologicznych. Potwierdza również doskonałą umiejętność planowania oraz prowadzenia badań naukowych przez Doktorantkę. **Praca z całą pewnością spełnia wymagania stawiane w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”, zatem zwracam się do Rady Dyscypliny Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Darii Jaworskiej-Krych do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Jednocześnie, biorąc pod uwagę:

- 1) wysoką wartość merytoryczną rozprawy,
- 2) zaawansowanie metod badawczych,
- 3) imponującą ilość przedstawionych wyników,
- 4) duży potencjał aplikacyjny pracy,
- 5) dojrzałość naukową Doktorantki,

wniosuję do Rady Dyscypliny Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi o **wyróżnienie**.

Justyna Kozłowska