



Dr hab. Marta Dudek, prof. CBMM  
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych  
Polskiej Akademii Nauk  
ul. H. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź  
tel. (42) 680 32 39  
e-mail: marta.dudek@cbmm.lodz.pl

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
BIURO RPD/1664/2024  
RADY DISCYPLINY NAUKI FARMACEUTYCZNEJ  
Podpis *Foralek* 30.01.2024.

Łódź, dn. 30.01.2024

## RECENZJA

pracy doktorskiej Pani mgr farm. Katarzyny Malec  
pt. 'Drug-surfactant interactions in micellar carriers of active pharmaceutical ingredients'

Praca doktorska Pani mgr farm. Katarzyny Malec została przygotowana pod kierunkiem dr hab. Bożeny Karolewicz, profesor uczelni, na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Dotyczy ona tworzenia, analizy i potencjalnych zastosowań leczniczych układów lek-związek powierzchniowo czynny. Muszę przyznać, że jest to pierwsza w mojej karierze tego typu dysertacja, która stanowi tak niezwykle szerokie podejście do problemu badawczego, począwszy od zastosowania zaawansowanych metod spektroskopii NMR do badań układów micelarnych, poprzez poszukiwanie nowych metod NMR-owych do opisu oddziaływań obecnych w micelach, a także wykorzystanie obliczeń dynamiki molekularnej do walidacji wyników uzyskanych z analizy spektroskopowej, aż do pogłębionej analizy działania biologicznego wytworzonych układów, uwzględniającej nie tylko moc i kinetykę takiego działania, ale i jego mechanizm. Jednocześnie należy zaznaczyć, że wybrana tematyka jest bardzo aktualna i wpisuje się w trend szukania nowych formułacji leków istniejących już na rynku farmaceutycznym, w celu poprawy lub modyfikacji ich działania, biodostępności, rozpuszczalności, stabilności lub innych parametrów fizykochemicznych. W dobie gdy tak trudno o wprowadzenie na rynek nowych substancji leczniczych opracowywanie lepszych postaci farmaceutycznych oferuje nowe życie dobrze znanym i stosowanym lekom. Taką rolę spełniają formułacje uzyskane w pracy mgr Malec: wykazują one zwiększoną aktywność przeciwgrzybiczą oraz rozszerzają wachlarz dostępnych postaci farmaceutycznych badanego leku (flukonazolu). Warto podkreślić, że aktualność tej tematyki badawczej potwierdza przyznany Doktorantce przez Narodowe Centrum Nauki grant ETIUDA.

Podstawą pracy doktorskiej są dwie publikacje opublikowane w znakomitych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (oba czasopisma Q1) oraz aplikacja patentowa. Należy podkreślić ten aplikacyjny wymiar pracy, co nie zdarza się często w tego typu rozprawach, tym bardziej, że Doktorantka umiejętnie oferuje płynne przejście od badań podstawowych do aplikacji, tak bardzo potrzebne dzisiaj nauce. Praca napisana jest po angielsku, co uznaję za jej zaletę, ponieważ jako taka może stanowić cenną pozycję literaturową dla społeczności międzynarodowej. Zgodnie z wymogami Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. 2018 poz. 1668) Doktorantka zamieszcza w niej streszczenia w językach polskim i angielskim, zwięźle prezentuje we wstępie ważność i aktualność podejmowanej tematyki w świetle istniejącej wiedzy, a



następnie podsumowuje najważniejsze wyniki i wnioski opisane w publikacjach. Opis ten obejmuje wraz z pozycjami literaturowymi 70 stron. Do pracy dołączone są teksty obu publikacji stanowiących trzon rozprawy wraz z materiałami uzupełniającymi.

W publikacji 1 ("Unravelling the mechanisms of drugs partitioning phenomena in micellar systems via NMR spectroscopy" *Journal of Colloid and Interface Science*, 2023, 638, 135-148) mgr Malec postawiła sobie za cel opracować nowe metody analizy oddziaływań leków z wybranymi związkami powierzchniowo czynnymi, tworzącymi micelle. Zadanie to jest niezwykle trudne z uwagi na dynamikę takich układów, niewielkie stężenie leku w stosunku do stężenia surfaktantu oraz przejściowy charakter oddziaływań występujących między cząsteczką leku a związkiem powierzchniowo czynnym. Aby zmierzyć się z tym wyzwaniem Doktorantka sięgnęła po zaawansowane metody spektroskopii NMR. W pierwszej kolejności analizowała dane spektralne uzyskane ze standardowych eksperymentów jednowymiarowych (zmiany w przesunięciach chemicznych  $^1\text{H}$  i  $^{19}\text{F}$  wraz ze zmieniającym się stężeniem surfaktantu), następnie z eksperymentów dwuwymiarowych (oddziaływania między- i wewnątrzcząsteczkowe w widmach  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY i  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  HOESY, widma  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC do przypisania sygnałów rezonansowych), a wreszcie z eksperymentów STD-NMR, pozwalających na jednoznaczne wskazanie czy badane cząsteczki leków wchodzi w interakcje z cząsteczkami surfaktantów zagregowanymi w micelle. Ponadto, Doktorantka po raz pierwszy zastosowała do analizy układów micelarnych metodę DEEP-STD-NMR, opracowaną kilka lat wcześniej do opisu oddziaływań białko-ligand. Metoda ta polega na naświetlaniu wybranych częstości odpowiadających larmorowskiemu częstościom rezonansowym hydrofilowej i hydrofobowej części cząsteczek surfaktantów i obserwowaniu które sygnały leku w wyniku tego naświetlania ulegają osłabieniu. Dzięki temu możliwe jest określenie preferowanych przez badane cząsteczki leku miejsc oddziaływań z tworzonymi przez surfaktanty micelami. Zestawienie tych danych z danymi z widm NOESY i wsparte symulacjami dynamiki molekularnej ukazuje pełną i szczegółową mapę interakcji w układach lek-surfaktant. Stosując opracowaną metodologię Doktorantka udowodniła, że:

- Micelle tworzone przez surfaktanty polioksyetylenowe nie odpowiadają typowo zakładanemu w literaturze układowi rdzeń-powłoka, w którym to hydrofobowe części cząsteczek skierowane są do wnętrza miceli, zaś hydrofilowe na zewnątrz; zamiast tego zaproponowane zostały modele z domenami hydrofilowymi i hydrofobowymi obecnymi na powierzchni miceli;
- Lek o większej hydrofilowości (flukonazol) wykazywał mniejszą tendencję do oddziaływania z micelami, zaś lek o większej hydrofobowości (indometacyna) preferencyjnie gromadził się na powierzchni miceli;
- Układy micelarne znacznie zwiększały rozpuszczalność indometacyny, leku słabo rozpuszczalnego w wodzie, ale w niewielkim stopniu wpływały na rozpuszczalność flukonazolu, leku o większej rozpuszczalności w wodzie;
- Żaden z badanych leków nie wykazywał wyraźnej preferencji do oddziaływania z hydrofilowymi lub hydrofobowymi domenami miceli; zamiast tego wybrane fragmenty



cząsteczek leków preferencyjnie ustawiały się w kierunku hydrofilowych lub hydrofobowych domen obecnych na powierzchni miceli;

- Zmiany parametrów NMR, w szczególności tych opisanych z zastosowaniem DEEP-STD-NMR, pozwalają na dokładny opis trudnych do uchwycenia, przejściowych oddziaływań w układach lek-micela.

W moim odczuciu są to duże osiągnięcia. Ich wagę podkreśla również fakt, że omawiana praca ma na dzień dzisiejszy już 5 cytowań, choć opublikowana została zaledwie rok temu. Muszę jednak przyznać, że choć jestem pod wrażeniem uzyskanych przez mgr Malec wyników badań, ich opis przedstawiony w pracy doktorskiej jest w moich oczach nieco mniej godny podziwu. W zamyśle Ustawodawcy wstęp literaturowy i krótki „przewodnik” po opublikowanych pracach stanowiących podstawę pracy doktorskiej ma czytelnikowi ułatwić ich czytanie i umieścić w szerszym kontekście całej pracy i dostępnej literatury. O ile można uznać, że ten drugi cel został spełniony, o tyle ten pierwszy w moim odczuciu nie jest, zwłaszcza w odniesieniu do publikacji 1. Zamiast bowiem stanowić zwięzłe podsumowanie uzyskanych wyników i przede wszystkim płynących z nich wniosków jest on w zasadzie dość chaotycznym i miejscami trudnym do zrozumienia powtórzeniem rezultatów opisanych w publikacji. Umiejętność zwięzłej prezentacji uzyskanych wyników badań, wyboru które z nich są istotne i warte podkreślenia, a także jasnego wskazania płynących z nich wniosków jest jedną z ważnych cech dojrzałego naukowca. W moim odczuciu takiej dojrzałości nieco zabrakło w „przewodniku”. Dodatkowo, jedyna ilustracja w tym opisie (rysunek 5) jest mało czytelna z uwagi na swoją „hasłowość” i mały druk, a do tego umieszczona jest na samym początku tekstu, co bardzo utrudnia płynne jego czytanie. Dzieje się tak chociażby dlatego, że Doktorantka często odnosi się do konkretnych atomów badanych cząsteczek, co wymusza ciągle powracanie do pierwszej strony opisu.

Z merytorycznych kwestii w odniesieniu do publikacji 1 moją szczególną uwagę zwróciła interpretacja widm NOESY. W kilku miejscach pracy Doktorantka wspomina, że nie obserwowano korelacji międzycząsteczkowych lek-surfaktant w widmach NOESY (m.in. dla flukonazolu i niższych stężeń Pluronic F-127 czy indometacyny i flukonazolu z Tween 20 w stężeniach bliskich CMC) i wyciąga z tego faktu wnioski dotyczące oddziaływań w tych układach. Tymczasem, efekt NOE zależy od  $\omega_{TC}$  (co zresztą Doktorantka dobrze wykorzystuje w rozróżnieniu oddziaływań wewnątrz- i międzycząsteczkowych) i dla pewnych wartości czasów korelacji może wynosić 0. Teoretycznie więc brak sygnału korelacyjnego może wynikać nie tylko z braku oddziaływania, ale też z przypadkowego znalezienia się w reżimie „zerowego” NOE. Czy taka możliwość była rozważana przez Doktorantkę? Ponadto, czy jest jakaś przyczyna dla której Doktorantka posługuje się niezbyt zręcznym w mojej ocenie sformułowaniem „sygnały o fazie tej samej co diagonalą” lub „sygnały o fazie przeciwnej niż diagonalą” zamiast posługiwać się terminami „dodatni efekt NOE” i „ujemny efekt NOE”? Wreszcie, nie rozumiem skąd wziął się wniosek o oddziaływaniu pomiędzy agregatami SLS na podstawie obserwowania sygnałów korelacyjnych o obu fazach w widmach NOE - czy nie może to po prostu świadczyć o oddziaływaniu wewnątrzcząsteczkowym w obrębie



swobodnych cząsteczek SLS (dodatni NOE) i międzycząsteczkowych w obrębie cząsteczek zaangażowanych w tworzenie miceli (ujemny NOE)?

W publikacji 2 („Pluronic® F-127 enhances antifungal activity of fluconazole against resistant *Candida* strains.” *ACS Infectious Diseases* 2024, 10, 215-231) Doktorantka opisuje pogłębioną analizę wpływu jednej z badanych w publikacji 1 formułacji (Pluronic F-127 z flukonazolem) na wzrost drożdżaków z rodzaju *Candida*. Przedstawione badania obejmują nie tylko badania reologiczne i opis wpływu formułacji na odporne i wrażliwe na flukonazol szczepy drożdży, ale też jego zależności od stężenia flukonazolu i surfaktanta, kinetyki, wpływu samego surfaktanta oraz, co warto podkreślić, mechanizmu działania. Tak kompleksowe podejście wymagało od Doktorantki opanowania szerokiego wachlarza technik eksperymentalnych i doprowadziło m.in. do następujących odkryć:

- flukonazol i Pluronic F-127 stosowane razem wykazują istotnie lepsze działanie przeciwgrzybicze przeciwko opornym na flukonazol szczepom drożdży w porównaniu do czystego flukonazolu, przy jednoczesnym braku hamowania wzrostu komórek drożdży pod wpływem samego surfaktanta; tym samym można postulować synergistyczne działanie badanej formułacji;
- obserwowane działanie przeciwgrzybicze trwało nawet do 20 h i było zależne od dawki;
- Pluronic F-127 wykazywał dwojakie działanie na komórki drożdży: zmniejszał ekspresję genów kodujących transmembranowe białka usuwające z komórek toksyczne dla niej flukonazol i werapamil oraz zmniejszał integralność błon komórkowych grzyba; drugi z obserwowanych mechanizmów działania surfaktanta został uznany za mniej istotny w synergistycznym działaniu z flukonazolem.

W tej części pracy doktorskiej nieco zabrakło mi szerszego odniesienia do wyników uzyskanych w publikacji 1. Czy wgląd w interakcje lek-micela uzyskany w publikacji 1 pomaga w jakiś sposób lepiej zrozumieć wyniki badań uzyskanych w publikacji 2? Jedyne odniesienie w tym temacie jakie znalazłam znajduje się w dyskusji wyników w publikacji 2 i w „przewodniku” na stronie 52, ale przyznam szczerze, że nie jest dla mnie do końca zrozumiałe. Prosiłabym Doktorantkę o wyjaśnienie tego zagadnienia podczas obrony pracy doktorskiej. Dodatkowo, jako że nie jestem specjalistą od mikrobiologii i mówiąc szczerze nie znam dobrze mechanizmów oporności komórkowej na leki przeciwgrzybicze, byłabym ciekawa usłyszeć czy już sam fakt, że Pluronic F-127 zwiększa przepuszczalność błony komórkowej nie mógłby wpłynąć na zwiększenie ekspresji genów CDR1/2? Innymi słowy, czy i w jaki sposób dwa mechanizmy działania surfaktanta na komórki drożdży są ze sobą powiązane?

Oprócz wspomnianych wyżej kwestii merytorycznych, z obowiązku recenzenta wskazuję pewne drobne niedociągnięcia znalezione w pracy Pani Katarzyny Malec, nadmieniając jednocześnie, że nie mają one większego wpływu na moją wysoką jej ocenę. A są to m.in.:

- Używanie w streszczeniu nie tak szeroko rozpowszechnionych skrótów bez ich wyjaśnienia (SLS, STD-NMR, API);
- W moim odczuciu tytuł rozprawy nie w pełni oddaje jej zawartość; zwraca on szczególną uwagę na interakcje w układzie lek-surfaktant, podczas gdy to nie interakcje znajdują się



w centrum pracy, a raczej nowe formułacje leku, dla których (a) szczegółowo opisane są owe interakcje i (b) ich działanie biologiczne poddane jest dokładnej analizie;

- Niezbyt precyzyjne sformułowania, np. „The detected saturation concerns the saturated ligand molecules accumulated in bulk solution in the free state.” (str. 18) - to sygnały receptora są wysycane, a nie ligandu; rozumiem, że tu Doktorantce chodziło o sygnały ligandu, na które przeniesione zostało nasycenie (?), jednak nie wynika to z zacytowanego zdania; „micelles were created using a variety of molecules” (str. 30) - rozumiem, że tu chodzi o różną liczbę cząsteczek, a nie o różne cząsteczki, jak jest napisane?
- Niezbyt precyzyjne oznaczenia na rysunkach, np. na najniższym panelu rysunku 9 w publikacji 1 pomiędzy micelą a białkiem narysowana jest obustronna strzałka; domyślam się, że ma to obrazować fakt pewnego podobieństwa między układem białko-ligand a micela-lek, jednak strzałka sugeruje wzajemne przechodzenie w siebie, a nie podobieństwo; podobnie mylący wg mnie znak został zastosowany na rysunku 7 w „przewodniku” (podobny rysunek znajduje się też w publikacji 2) - tu również chodzi o najniższy panel i jego fragment dotyczący ekspresji genów - czerwona strzałka umieszczona przy genie ERG11 sugeruje, że jego ekspresja jest przez badane związki obniżana, co nie ma miejsca; zamiast tego można było zastosować poziomą kreskę, co byłoby bardziej zgodne z uzyskanymi wynikami; ponadto panel dot. analizy statystycznej jest ledwo czytelny;
- W tekście odwołującym się do rysunku 4 Doktorantka używa skrótów „MDR1” czy „CDR” na określenie genów kodujących białka ABCB1 (również w literaturze zwane MDR1) i CDR, zaś białka nie są określone za pomocą skrótów, tylko opisowo. Tymczasem na rysunku 4 skróty MDR i CDR wyraźnie odnoszą się do białek transportowych. Osoba postronna może mieć zatem wrażenie, że rysunek 4 sugeruje, iż to geny są wbudowane w membranę. Dobrze byłoby posługiwać się bardziej precyzyjnymi opisami, żeby zapobiec powstawaniu pomyłek w stylu: „Gen MDR1 to białko transportowe ...” (jest to rzeczywisty cytat ze strony internetowej). Jako naukowcy mamy obowiązek wypowiedzi w sposób na tyle precyzyjny, aby uniknąć sytuacji w których osoba niezwiązana z nauką, na podstawie naszego tekstu wyciągnie błędne wnioski. Ponadto, w naukach biologicznych jest dobra praktyka pisanie nazw genów kursywą, zaś nazw białek wielkimi literami - ten prosty zabieg pozwala uniknąć nieporozumień;
- literówki i błędy językowe, np. ‘intramolecular drug-surfactant cross-peaks’ zamiast ‘intermolecular drug-surfactant cross-peaks’(str. 16), ‘Heterogonous’ (str. 38) -> ‘Heterogenous’, ‘In SLS solutions, similarly the results observed for block copolymer’ (str. 37);
- czy rzeczywiście częstotści rezonansowe trzech różnych magnezów są takie same z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku? (str. 29) Nie jest to niemożliwe, ale byłoby sporym zbiegiem okoliczności.

Ostatnia rzecz, którą chciałabym poruszyć w niniejszej recenzji dotyczy wkładu Doktorantki w powstanie omawianych publikacji. Zgodnie z wymaganiami dotyczącymi publikacji wieloautorskich Pani mgr Malec zamieściła w swojej dysertacji oświadczenia współautorów o ich wkładzie w powstanie każdej z nich. Można na ich podstawie domniemać, że Doktorantka była odpowiedzialna za przeprowadzenie i analizę ogromnej części eksperymentów NMR, przygotowanie miceli, badania mikrobiologiczne, przygotowanie



wniosku do NCN o finansowanie badań i być może inne aspekty opisanych badań, jednak nigdzie nie znalazłam jasnej deklaracji o wkładzie Doktorantki w omawiane prace. Analiza oświadczeń współautorów pozwala się domyślać, że był on znaczący, tym bardziej, że Doktorantka w publikacji 2 jest jednym z autorów korespondujących (jedynym z polskiej instytucji), nie powinno to jednak pozostawać w sferze domysłów. Proszę o uzupełnienie informacji na ten temat w czasie obrony pracy doktorskiej.

Przechodząc do konkluzji, chciałabym jeszcze raz podkreślić, że mimo pytań i niektórych krytycznych uwag oceniam przedstawioną do recenzji pracę bardzo wysoko. Jest ona niezwykle interdyscyplinarna: rzadko się zdarza, aby doktorant czy doktorantka prowadzili tak kompleksowe badania obejmujące zarówno zastosowanie i rozwój zaawansowanych metod analizy struktury i oddziaływań badanych układów, ich właściwości fizykochemiczne oraz pogłębioną analizę działania biologicznego, włączając w to określenie potencjalnego mechanizmu działania. Jest dla mnie jasne, że aby tego dokonać Pani mgr Katarzyna Malec musiała opanować wiele niezwykle różnych technik badawczych, wykazując się przy tym dojrzałością naukową i otwartością na odmienne spojrzenia z perspektywy każdej z nich. Należy jeszcze raz docenić również umiejętność płynnego przejścia od badań podstawowych do aplikacyjnych w wynikach Doktorantki. Z uwagi na przytoczone argumenty, uważam, że przedstawiona praca doktorska prezentuje szeroką wiedzę Pani mgr Katarzyny Malec w dyscyplinie nauki farmaceutycznej oraz stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Spełnia tym samym warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 roku poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 2 i 3 Ustawy z 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.). Wnoszę zatem z przekonaniem do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie rozprawy mgr Katarzyny Malec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, mając na uwadze wartość naukową przedstawionych wyników oraz niezwykle interdyscyplinarny charakter pracy wnioskuję o jej wyróżnienie, pod warunkiem jednak, że Doktorantka przedstawi w trakcie obrony w satysfakcjonujący sposób brakującą informację o Jej wkładzie w powstanie publikacji stanowiących podstawę pracy.

*M. Dudek*

Dokument podpisany  
przez Marta Katarzyna  
Dudek  
Data: 2024.01.30  
11:04:53 CET