



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biologii Rozwoju i Nauk Biomedycznych
Zakład Cytologii



Warszawa, 28 lipca 2025

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Pauliny Słonimskiej
„Pro-regenerative alginate-based formulations of zebularine
and retinoic acid for subcutaneous delivery”
wykonanej na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej
pod kierunkiem prof. dr. hab. inż. Pawła Sachadyna

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi uchwała Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Gdańskiej z dnia 20 maja 2025 roku w sprawie wyznaczenia składu Komisji do przeprowadzenia postępowania w sprawie o nadanie stopnia doktora dla mgr inż. Pauliny Słonimskiej.

Formalny opis rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska przygotowana została w języku angielskim i składa się ze 143 stron. Zawiera 7 rozdziałów poprzedzonych streszczeniem rozprawy w języku polskim i angielskim, a także uzupełnionych o kilka dodatkowych elementów takich, jak: podsumowanie, perspektywy, wykaz głównych skrótów i symboli, spis literatury liczący 321 pozycji, wykaz ilustracji, wykaz tabel i informacje o osiągnięciach naukowych Pani mgr inż. Pauliny Słonimskiej. Zawartość rozprawy doktorskiej i podział treści są w pełni uzasadnione i poprawne.

Merytoryczny opis rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Pauliny Słonimskiej dotyczy możliwości wykorzystania 2 związków chemicznych – zebularyny, inhibitora metylotransferazy DNA, a także kwasu retinowego, regulatora transkrypcji, podawanych z 2% alginianem sodowym do stymulacji regeneracji tkanek poprzez indukcję ekspresji genów o korzystnym wpływie na proces naprawy tkanek. Jako model

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 42 203
e-mail: k.archacka@uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

badawczy Pani mgr inż. Paulina Słonimska wykorzystała uszkodzenie małżowiny usznej myszy. W przeprowadzonych doświadczeniach Pani mgr inż. Paulina Słonimska zastosowała autorską metodę formułacji zebularyny i kwasu retinowego z użyciem młyna kulowego. Opisane w rozprawie doktorskiej wyniki obserwacji mikroskopowych wskazują na to, iż – zgodnie z przewidywaniami – hydrofobowy kwas retinowy był rozproszony w formie drobnych kryształów w 2% alginianie sodowym natomiast hydrofilowa zebularyna utworzyła homogeną formułację z alginianem sodowym. Po podaniu w/w mieszaniny, tj. 2% alginianu sodowego (nieżelowanego) z dodatkiem zebularyny i kwasu retinowego Pani mgr inż. Słonimska zaobserwowała – za pomocą przyżyciowej ultrasonografii - i opisała w swojej rozprawie doktorskiej stopniową absorpcję alginianu umożliwiającą uwolnienie związków czynnych w miejscu podania mieszaniny i stopniową regenerację małżowiny usznej. Po 10 dniach od pierwszej iniekcji w/w mieszanina została powtórnie podana w celu podtrzymania działania składających się na nią substancji. W wariantach kontrolnych Autorka zastosowała mieszaninę alginianu sodowego tylko z zebularyną, alginianu sodowego tylko z kwasem retinowym lub sam alginian sodowy. Analiza wykonana między 7 a 42 dniem po uszkodzeniu małżowiny wykazała, że we wszystkich punktach czasowych najbardziej zaawansowany, statystycznie lepszy stopień regeneracji małżowiny usznej wystąpił po zastosowaniu alginianu sodowego z obiema testowanymi substancjami, tj. zebularyną i kwasem retinowym. Struktura zrekonstruowanej małżowiny usznej została przedstawiona w publikacji Słonimska et al., 2024. Informacje zawarte w recenzowanej rozprawie doktorskiej wskazują na to, że podana mieszanina nie wywołała niepożądanych efektów po podaniu do biorców, a zatem była dobrze tolerowana. Towarzyszące w/w przytoczonym wynikom ilustracje są bardzo dobre choć zdjęcia przedstawione na Rycinie 10B są mało czytelne ze względu na niewielki rozmiar. Ze względu na zaobserwowane i opisane w rozprawie i powyżej efekty podania różnych mieszanin lub samego alginianu w dalszych doświadczeniach opisanych w rozprawie doktorskiej zastosowano wariant eksperymentalny (alginian sodowy z obydwoma substancjami) i wariant kontrolny (sam alginian sodowy).

Kompleksowa analiza RT-qPCR objęła ocenę poziomu transkryptów 27 czynników opisanych w literaturze przedmiotu jako zaangażowane w regenerację tkanek i gojenie ran, w tym markerów pluripotencji, czynników wzrostu, regulatorów neurogenezy czy elementów ścieżki sygnalizacyjnej Wnt. Analiza została przeprowadzona w 7,14, 21 i 42 dniu po uszkodzeniu małżowiny usznej, w 3 obszarach (3 mm – obszar regeneracji, bezpośrednio przy miejscu uszkodzenia, 5 mm – obszar przylegający do miejsca uszkodzenia, oraz w miejscu nieuszkodzonym).

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106
e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

Wyniki tej analizy Autorka przedstawiła na Rycinach od 12 do 18, a także w Tabelach 4-14. W tej części mam uwagę dotyczącą wykresów, które byłyby bardziej przystępne i czytelne, gdyby skala na wszystkich wykresach dla tego samego transkryptu była taka sama (o ile oczywiście jest to osiągalne, ale w większości przypadków takie ujednolicenie byłoby możliwe). W tej części szczególnie wartościowym wynikiem jest wykazanie istotnie wyższego poziomu *Egf*, czynnika wzrostu łagodzącego stan zapalny, tworzenie blizn, a także stymulującego produkcję kolagenu, po podaniu do uszkodzonej małżowiny mieszaniny alginianu sodowego z obiema substancjami w porównaniu do samego alginianu (Rycina 13, Tabela 5). Z obowiązku recenzentki zwracam uwagę na to, że w Tabeli 5 podano wartości dla *Vegf*, ale na Rycinie 13 brakuje wykresów dla tego czynnika.

Analiza poziomu transkryptów czynników zaangażowanych w regulację neurogenezy (*Reo1*, *Neurog1*, *Gdnf* oraz *Tac1*) przeprowadzona przez Panią mgr inż. Paulinę Słonimską pozwoliła na stwierdzenie, że zaobserwowany przez Autorkę efekt pro-regeneracyjny po podaniu alginianu sodowego zawierającego zebularynę i kwas retinowy nie jest związany ze stymulacją neurogenezy w odbudowywanej małżowinie usznej myszy (Rycina 15, Tabela 6). Z kolei wyraźny wpływ zastosowania w/w mieszaniny Autorka wykazała dla elementów ścieżki sygnalizacyjnej Wnt (Rycina 17, Tabela 8), szeroko opisaną w literaturze przedmiotu, a także w ocenianej rozprawie doktorskiej jako zaangażowanej m.in. w regulację regeneracji różnych tkanek i gojenia ran. Wyniki zaprezentowane w rozprawie doktorskiej wskazują także na statystycznie istotnie wyższy poziom transkryptów niektórych czynników znanych m.in. jako induktory proliferacji fibroblastów, wydzielania składników ECM i gojenia ran, np. *Acta2* oraz *Ccn2* w 42 dniu analizy po zastosowaniu alginianu z obydwoima substancjami (Rycina 18, Tabela 9).

Przytoczone przeze mnie powyżej wyniki przedstawione zostały w Rozdziale 7 ocenianej rozprawy doktorskiej. Ta część poprzedzona jest informacjami o materiałach i metodach wykorzystanych w doświadczeniach opisanych w rozprawie doktorskiej (Rozdział 6), a wcześniej częścią prezentującą cel badań zrealizowanych przez Panią mgr inż. Paulinę Słonimską i Rozdziałami 1-5 składającymi się na znakomite wprowadzenie do rozprawy doktorskiej. Choć cała oceniana rozprawa doktorska prezentuje wysoki poziom merytoryczny (a także redakcyjny, co opisałam dalej), chciałabym podkreślić, że lektura rozdziałów wprowadzających odbiorców w tematykę rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Pauliny Słonimskiej była wyjątkową przyjemnością. W rozdziałach tych Autorka przedstawiła kompleksowe, ale równocześnie starannie wyselekcjonowane informacje dotyczące różnych sposobów regeneracji tkanek i narządów, a także mechanizmu gojenia ran, ze szczególnym uwzględnieniem modelu uszkodzenia małżowiny usznej. Zamieszczone informacje są

uzupełnione bardzo dobrej jakości ilustracjami (np. Fig. 2, str. 23, przedstawiająca strukturę histologiczną małżowiny usznej). W Rozdziale 3 Autorka w przystępny i wartościowy merytorycznie sposób przedstawiła sposoby stymulacji regeneracji tkanek za pomocą różnych związków chemicznych, w tym substancji leczniczych, a następnie w Rozdziale 4 opisała regulację regeneracji tkanek na poziomie epigenetycznym ze szczególnym uwzględnieniem roli oraz mechanizmów działania zebularyny i kwasu retinowego. W Rozdziale 5 zamykającym część wprowadzającą do rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Paulina Słonimska przedstawiła informacje dotyczące hydrożeli i ich roli jako nośników substancji leczniczych, w tym hydrożeli alginianowych scharakteryzowanych pod względem toksyczności, biogodności, sposobu żelowania, kinetyki uwalniania zawieszonych w nich substancji i degradacji po wprowadzeniu do organizmu, a także podała przykłady zastosowania takich hydrożeli w medycynie i badaniach biomedycznych. Nie mam żadnych uwag merytorycznych do informacji zawartych w Rozdziałach 1-5, a także Rozdziału 6 opisującego metodologię badawczą.

W nawiązaniu do informacji zawartych w Rozdziałach 1-5 (np., na stronie 14), a także wyników opisanych w Rozdziale 7 chciałabym jednak odnieść się do informacji dotyczących roli markerów pluripotencji, takich jak *Nanog* czy *Pou5f1* w regulacji regeneracji tkanek i gojenia ran. Jestem świadoma, że w różnych publikacjach dotyczących tej tematyki pojawiają się informacje o udziale markerów pluripotencji, ale zagadnienie to pozostaje kontrowersyjne. Publikacje takie nie prezentują przekonujących wyników pokazujących np. obecność w/w markerów na poziomie białka, a wykrywanie ich w analizie RT-qPCR może być związane z występowaniem pseudogenów tych czynników (np. Liedtke i wsp., 2007). W odniesieniu do ocenianej rozprawy doktorskiej, z informacji zamieszczonych na Rycinie 12 i w Tabeli 4 trudno jest – bez podania wartości delt CT – wywnioskować, jaki był rzeczywisty poziom transkryptów markerów pluripotencji (a także innych czynników opisanych w rozprawie doktorskiej, choć ich rola w regulacji regeneracji tkanek nie jest tak kontrowersyjnym zagadnieniem, jak w przypadku markerów pluripotencji). W przypadku wysokich wartości delt CT poziom ten mógł być śladowy/zaniedbywalny.

Poprawność redakcyjna rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Pauliny Słonimskiej została przygotowana niezwykle starannie pod względem redakcyjnym. Z obowiązku recenzentki zaznaczam, że w publikacji Bouhadir, Lee et al., cytowanej na stronie 39 nie podano roku publikacji; w spisie literatury ta informacja jest uzupełniona (publikacja nr 29). W całej rozprawie doktorskiej można znaleźć pojedyncze usterki edytorskie (np. brak indeksu górnego przy symbolu jonów wapnia, str. 88), co nie zmienia faktu, że rozprawa doktorska wyróżnia się pod względem dbałości o warstwę redakcyjną.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106
e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

Podsumowanie

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską uważam za wartościową, potwierdzającą ogólną wiedzę teoretyczną Pani mgr inż. Pauliny Słonimskiej, a także zawierającą cenne merytorycznie wyniki badań i płynące z nich wnioski. W związku z tym oceniam rozprawę doktorską jednoznacznie pozytywnie. Atutem rozprawy jest podjęta oryginalna tematyka badawcza, a także analizy laboratoryjne, które Autorka przeprowadziła i zinterpretowała w rzetelny sposób. Płynące z nich wnioski stanowią doskonały punkt wyjścia do dalszych badań. Biorąc pod uwagę całokształt rozprawy stwierdzam, że Pani mgr inż. Paulina Słonimska bez wątpienia wykazała się umiejętnością planowania i prowadzenia eksperymentów naukowych, a także opracowania i krytycznej dyskusji uzyskanych wyników. Pani mgr inż. Paulina Słonimska potrafi więc samodzielnie prowadzić pracę naukową, na co wskazuje osiągnięcie celu badawczego za pomocą adekwatnych metod i sformułowanie wniosków końcowych, a także współautorstwo 5 publikacji naukowych i 3 patentów, udział w 7 konferencjach naukowych i 5 projektach badawczych.

W mojej opinii przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a zatem ma niezaprzeczalną wartość naukową i tym samym spełnia wszystkie warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, póź. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Gdańskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Pauliny Słonimskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie

Wnoszę również o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Pauliny Słonimskiej. Wniosek ten uzasadniam tym, że w recenzowanej rozprawie Pani mgr inż. Paulina Słonimska szczegółowo opisała autorską metodę przygotowania mieszaniny alginianu sodowego z inhibitorem metylotransferazy DNA (zebularyną) oraz aktywatorem transkrypcji (kwasem retinowym). Innowacyjnym elementem jest zastosowanie młyna kulowego do wydajnego połączenia w/w substancji, co pozwala na pominięcie szkodliwych związków chemicznych takich, jak DMSO. Ponadto, w/w mieszanina została przygotowana w sposób umożliwiający jej wstrzyknięcie, co jest korzystne pod względem jej potencjalnego klinicznego zastosowania. Autorka precyzyjnie opisała wpływ tak przygotowanego materiału na profil ekspresji genów istotnych w regulacji regeneracji tkanek na przykładzie modelu uszkodzenia małżowiny usznej myszy.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106
e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

Opracowana przez Panią mgr inż. Paulinę Słonimską metoda jest znacząco lepsza niż poprzednio opisane rozwiązania ze względu na możliwość synergistycznego działania obu substancji zawieszonych w alginianie sodowym, bez konieczności wielokrotnego podawania w/w związków chemicznych w celu osiągnięcia efektu regeneracyjnego. Połączenie obu substancji z alginianem sodowym pozwoliło na ich stopniowe uwalnianie po wprowadzeniu mieszaniny do organizmu myszy, precyzyjne dostarczenie materiału do miejsca uszkodzenia, a w konsekwencji – dało możliwość uproszczenia protokołu stymulacji regeneracji tkanek za pomocą w/w substancji. Warto również podkreślić, że nie stwierdzono skutków ubocznych takiej procedury. Ponadto, Pani mgr inż. Paulina Słonimska po raz pierwszy wykazała, że zebularyna tworzy homogeną formulację w 2% alginianie sodowym nawet w ilości 240 mg na 1 ml nośnika, co 5-krotnie przekracza opisane wcześniej stężenie tej substancji w wodnym roztworze, a także, że 2% alginian sodowy jest odpowiedni zarówno w przypadku stosowania zebularyny, jak i kwasu retinowego, i jest istotnie lepszy niż chitosan, również badany i precyzyjnie scharakteryzowany przez Autorkę w rozprawie doktorskiej, który może wywołać odpowiedź immunologiczną *in vivo*.

Karolina Dziekan