



Bydgoszcz, dnia 10 sierpnia 2025 r.

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauliny Słonimskiej

pod tytułem.: „Pro-regenerative alginate-based formulations of zebularine and retinoic acid for subcutaneous delivery”

Dominującym sposobem gojenia się ran dorosłych ssaków jest włóknienie (naprawa), regeneracja dotyczy wybranych tkanek, niewielkich urazów i nie jest kompleksowa. Gojenie poprzez włóknienie stanowi ogromny problem medyczny wykraczający poza estetykę (bliznowacenie)- prowadzi do dysfunkcji narządów, przewlekłego bólu i obniżenia jakości życia.

Wykorzystanie mechanizmów regulacji epigenetycznej jako narzędzia do indukcji regeneracji tkanek jest jednym z najbardziej innowacyjnych, a zarazem interesujących zagadnień badawczych współczesnej medycyny regeneracyjnej.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Pauliny Słonimskiej jest kontynuacją badań prowadzonych pod kierunkiem prof. Pawła Sachadyna dotyczących możliwości wykorzystania modulatorów epigenetycznych- w farmakologicznej indukcji regeneracji tkanek. We wcześniejszych badaniach dowiedziono, że wykorzystanie zebularyny (modulator epigenetyczny) w połączeniu z kwasem retinowym (aktywator transkrypcji) stymuluje regenerację małżowiny usznej u myszy (Sass, Sosnowski, et al. 2019). W recenzowanej rozprawie doktorskiej skupiono się na opracowaniu skutecznej metody dostarczania substancji aktywnych indukujących regenerację tj. zebularyny i kwasu retinowego.

Badania mające na celu dobór odpowiedniego nośnika substancji aktywnej dla modulatorów epigenetycznych są niezwykle cenne nie tylko z punktu widzenia opracowania skutecznej



metody indukcji regeneracji tkanek poprzez ukierunkowane dostarczenie odpowiedniej ilości substancji aktywnej, czy przedłużone uwalnianie substancji aktywnej w miejscu podania w czasie, a tym samym zwiększenie skuteczności terapeutycznej, ale niosą za sobą również aspekt praktyczny, taki jak chociażby zmniejszenie częstości podań substancji aktywnej. Mając na względzie powyższe, należy z całą mocą podkreślić, że wybór tematu badań recenzowanej rozprawy doktorskiej jest niezwykle trafny i adekwatny do aktualnych potrzeb badawczych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska napisana jest w języku angielskim, ma układ typowy dla pracy doświadczalnej. Praca zawiera 143 strony wydruku podzielonego na 7 podrozdziałów. Dodatkowo przedstawiono streszczenia w języku polskim i angielskim, komentarze końcowe, perspektywy na przyszłość, wykaz stosowanych skrótów, piśmiennictwo, spis tabel i rycin oraz osiągnięcia naukowe Autorki. Rozprawa zawiera 14 tabel i 18 rycin. Spis piśmiennictwa zawiera 321 pozycji, w tym pozycje nowe (do 10 lat) stanowią 47%. Część starszych pozycji jest z całą pewnością niezbędna do wnikliwej analizy dysertacji.

Wprowadzenie do pracy stanowi bardzo obszerne, liczące 45 stron opracowanie, w którym Autorka zdefiniowała pojęcia gojenie ran i regeneracja oraz przedstawiła mechanizmy regeneracji. Opisała również uszkodzenie małżowiny usznej jako model badań nad regeneracją. Kolejne podrozdziały poświęcono farmakologicznie indukowanej regeneracji, w tym roli mechanizmów epigenetycznych w procesach regeneracyjnych. Przedstawiono podstawowe mechanizmy epigenetyczne, w tym rolę metylacji DNA w regulacji ekspresji genów oraz przykłady epigenetycznych mechanizmów w regeneracji tkanek. W dalszej części opisano kolejno: epigenetyczne inhibitory i aktywatory regeneracji, oraz synergistyczne pro-regeneracyjne właściwości zebularyny i kwasu retinowego. W ostatnim podrozdziale Autorka uzasadnia wybór alginianu sodu jako nośnika substancji aktywnej.

Tak przygotowany wstęp teoretyczny zawierający logicznie usystematyzowany tok narracji doskonale wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy i uzasadnia podjęcie przedmiotu badań. Z recenzenckiego obowiązku zwracam uwagę na drobne potknięcia, które zauważyłam przeczytawszy rozdziały 1-5.



1. Autorka rozprawy definiuje gojenie się ran i regenerację jako dwa odrębne procesy. Tymczasem gojenie się ran może przebiegać poprzez naprawę (reparację) albo regenerację. Innymi słowy regeneracja jest jednym ze sposobów gojenia się tkanek.
2. Opisując rolę makrofagów w procesie gojenia warto byłoby podkreślić pro-regeneracyjne właściwości spolaryzowanych alternatywnie makrofagów M2 oraz znaczenie przejścia makrofagów z fenotypu M1 do M2, które jest kluczowe dla efektywnej regeneracji.
3. Analiza toksyczności (badanie toksyczności układowej) jest jednym z badań biokompatybilności biomateriału. Toksyczność alginianu (podrozdział 5.1.4) powinna być zatem opisana razem z biokompatybilnością alginianu (podrozdział 5.1.5), a nie jako osobny podrozdział.

Celem rozprawy doktorskiej było opracowanie skutecznej metody dostarczania substancji aktywnych o działaniu pro-regeneracyjnym: zebularyny i kwasu retinowego do miejsca gojenia się rany oraz ocena molekularna procesu regeneracji. Badanie obejmowało opracowanie formułacji alginianowych jako nośników zebularyny i kwasu retinowego.

Eksperyment badawczy przeprowadzono za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Bydgoszczy na myszach BALB/c. W rozdziale „Materiały i Metody”. Doktorantka przedstawiła metodykę opisując kolejno: przygotowanie formułacji alginianu sodu oraz chitozanu wraz z substancjami aktywnymi, model uszkodzenia małżowiny usznej oraz grupy badawcze, badania ultrasonograficzne i molekularne oraz metody statystyczne użyte do oceny uzyskanych wyników. W mojej ocenie całość badania została zaplanowana prawidłowo, ale brakuje tu oceny histologicznej regenerowanej małżowiny usznej, chociażby w końcowym okresie obserwacji, która dostarczyłaby cennych informacji co do struktury



regenerowanych tkanek czy też biokompatybilności nośników alginianowych/chitozanowych badanych substancji aktywnych.

Pytaniami, które nasuwają się po przeczytaniu tej części dysertacji, a na które odpowiedzi nie znalazłam w jej kolejnych częściach są:

1. W jaki sposób dobrano stężenia alginianu sodu jako nośnika substancji aktywnych?
2. Na jakiej podstawie zdecydowano, czy i kiedy podać drugą dawkę? Czy pojedyncza dawka była niewystarczająca do uzyskania pożądanego efektu regeneracyjnego?
3. Czy oceniano kinetykę uwalniania zebularyny i kwasu retinowego z nośników alginianowego/chitozanowego?

Wyniki badania przedstawiono w bardzo przejrzysty sposób z wykorzystaniem starannie opracowanych 11 tabel i 13 rycin. Jedyną uwagą krytyczną jest tutaj wielkość zdjęć dokumentujących makroskopowo proces zamykania ran małżowiny usznej po podaniu badanych związków. Połączenie wyników z elementami dyskusji pozwala na bezpośrednią konfrontację uzyskanych danych z danymi z piśmiennictwa.

Przeprowadzane badania wykazały, że 2% alginian sodu jest skutecznym nośnikiem zarówno dla hydrofilowej zebularyny jak i hydrofobowego kwasu retinowego. Skojarzone podanie zebularyny i kwasu retinowego w alginianie sodu prowadziło do ~73% zamknięcia rany małżowiny usznej w 42 dniu obserwacji. Pytanie jak uzyskane wyniki wypadają na tle wcześniejszych badań, w których podawano substancje aktywne bez nośników. Czy połączenie zebularyny i kwasu retinowego z nośnikiem alginianowym pozwoliło na uzyskanie lepszego efektu pro-regeneracyjnego?

Co ciekawe, zastawanie jako nośnika zebularyny i kwasu retinowego 0,75% chitozanu prowadziło aż do ~84% zamknięcia rany małżowiny usznej w 42 dniu obserwacji. Niezrozumiałym pozostaje tutaj fakt, dlaczego pomimo tak dobrych wyników dla chitozanu



odstąpiono od przeprowadzenia dalszych analiz z wykorzystaniem tego nośnika? Argumenty, które przytacza Doktorantka, dotyczące gorszych właściwości chitozanu w porównaniu do alginianu sodu w zakresie wyższego ryzyka odpowiedzi immunologicznej, gorszej stabilności czy też rozpuszczalności w kwasie/ nasycenia dwutlenkiem węgla, znane były przed rozpoczęciem eksperymentu.

Niezwykle wartościową częścią pracy jest analiza molekularna procesu regeneracji małżowiny usznej. Badaniom poddano aż 27 markerów molekularnych pluripotencji, neurogenezy, szlaku Wnt, aktywności pro-fibrotycznej oraz czynniki wzrostowe biorące udział w gojeniu się tkanek. Warty podkreślenia jest fakt, iż analizę ekspresji genów prowadzono w 3 obszarach małżowiny usznej: obszarze regeneracji, obszarze bezpośrednio przylegającym do miejsca regeneracji oraz obszarze niepoddanym wcześniejszej ingerencji, oraz w 4 okresach obserwacji, co pozwala na dynamiczną ocenę zmian zachodzących w czasie poszczególnych faz gojenia się rany.

Wykazano istotne zmiany w ekspresji szeregu genów w tym markerów pluripotencji, neurogenezy, szlaku Wnt, czy czynników wzrostu zarówno w okresie obserwacji jak i pomiędzy grupami badawczymi. Istotne statystyczne różnice pomiędzy grupą badaną, a kontrolą obserwowano najczęściej w 42 dniu obserwacji, gdzie ekspresja genów pluripotencji (*Nanog*, *Pou5f1*, *Klf4*) czynników wzrostu (*Egf*), markerów neurogenezy (*Reno*), ścieżki Wnt (*Lrp6*, *Wnt10a*) czy włóknienia (*Acta2*, *Ccn2*) była istotnie statystycznie wyższa u zwierząt, którym podano zebularynę i kwas retinowy w nośnikach alginianowych. Bardzo ciekawym nieopisanym wcześniej zjawiskiem jest wzrost ekspresji genu *Fbxo15* w regenerującej małżowinie usznej zwierząt, którym podano zebularynę z kwasem retinowym w nośnikach alginianowych w porównaniu do kontroli. Wcześniejsze badania wskazywały głównie na rolę tego genu w pluripotencji i rozwoju embrionalnym, a nie w czasie gojenia się ran.

W rozdziale „Uwagi końcowe” Doktorantka przedstawia najważniejsze wyniki pracy. Brakuje tu, jednakże zwięzłego przedstawienia (wypunktowania) najważniejszych wniosków płynących z przeprowadzonych badań, o których przedstawienie proszę Doktorantkę w czasie publicznej obrony rozprawy doktorskiej.



Podsumowując, wysoko oceniam istotność i aktualność podjętej tematyki badawczej oraz trud pracy włożony w jej wykonanie. Wszelkie zawarte w recenzji uwagi, które musiałam z obowiązku poczynić w najmniejszym stopniu nie umniejszają naukowej i poznawczej wartości pracy. Dlatego podsumowując, z wielką satysfakcją stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Pauliny Słonimskiej pt.: „Pro-regenerative alginate-based formulations of zebularine and retinoic acid for subcutaneous delivery” odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim, co upoważnia mnie do przedłożenia Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Gdańskiej wniosku o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.