

Prof. dr hab. inż. Krzysztof Pielichowski  
Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej  
Politechnika Krakowska

## **Recenzja**

w postępowaniu habilitacyjnym dr Moniki Bzowskiej  
w oparciu o cykl publikacji powiązanych tematycznie stanowiących osiągnięcie  
naukowe pt. „Biologiczna charakterystyka nanomateriałów: polielektrolitowych  
nanokapsułek oraz samoorganizujących się miceli alginianu sodu z kurkumina  
pod kątem ich wykorzystania w nanomedycynie”

Podstawa opracowania recenzji: pismo nr 1203.5110.4.2022 z dnia 21.07.2022r.  
Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie  
prof. dr hab. Andrzeja Kozika wraz z załącznikami.

Dr Monika Bzowska ukończyła Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego, uzyskując w 2000r. tytuł magistra biotechnologii. Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii otrzymała w 2006 roku na podstawie rozprawy pt. „Regulacja ekspresji i aktywności sekretazy ADAM17 (TACE) przez czynniki związane ze stanem zapalnym”. Promotorem wyróżnionej pracy była dr hab. Joanna Bereta, a przewód doktorski przeprowadzono na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Habilitantka od 2004r. jest zatrudniona w Zakładzie Biochemii Komórki, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, początkowo na stanowisku asystenta, a od 2009r. adiunkta.

### Ocena osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe dr Moniki Bzowskiej pt. „Biologiczna charakterystyka nanomateriałów: polielektrolitowych nanokapsułek oraz samoorganizujących się miceli alginianu sodu z kurkumina pod kątem ich wykorzystania w nanomedycynie” oparte jest na cyklu pięciu powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w

czasopismach „Int J Nanomedicine” (trzy artykuły, IF=4,54 (2018); 5,115 (2019/2020)), „Colloids Surf A, Physicochem. Eng. Aspects” (IF=3,131) i ”Colloids Surf B Biointerfaces” (IF=3,887). Wymienione publikacje są wieloautorskie, a wkład Habilitantki wynosi 40-50%, jest więc znaczący i wiodący w odniesieniu do badań biologicznych.

Sumaryczny IF prac dr Bzowskiej wynosi 138,731 (sumaryczny IF prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora: 126,12), suma punktów MNiSW: 3940 (suma punktów MNiSW po uzyskaniu stopnia doktora: 3560), suma cytowań: 609, suma cytowań bez autocytowań: 503, indeks Hirscha: 14. Wartości parametrów naukometrycznych są na bardzo dobrym poziomie dla dyscypliny nauki biologiczne i świadczą o zainteresowaniu pracami Kandydatki w środowisku naukowym.

Intensywny rozwój w obszarze otrzymywania i charakteryzowania nanomateriałów w ostatnich trzech dekadach doprowadził do opracowania szeregu nowych układów nanostrukturalnych o polepszonych właściwościach w porównaniu do układów mikro- i makrokopowych. Duże nadzieje wiąże się z nanomateriałami, które mogą znaleźć zastosowanie w medycynie i farmacji w postaci (nano)nośników leków, składników szczepionek, implantów oraz związków do obrazowania. Niestety, liczba nanofarmaceutyków dopuszczonych do stosowania nie jest duża; jedną z kluczowych przyczyn takiego stanu rzeczy jest toksyczność nanomateriałów, której powody (oraz skutki) nie są jeszcze w pełni wyjaśnione. Badania prowadzone przez dr Bzowską w obszarze zdolności do transportu leków i toksyczności polielektrolitowych nanokapsułek i samoorganizujących się miceli dotyczą poznawania zjawisk związanych z zachowaniem się (nano)układów biomedycznych wpisują się w aktualne trendy badawcze i koncentrują się na czterech zagadnieniach:

- polielektrolitowe nanokapsułki jako nośniki dla hydrofobowych leków przeciwnowotworowych – paklitakselu i kamptotecyny,
- ocena toksyczności polielektrolitowych nanokapsułek w warunkach *in vitro* na wybranych mysich i ludzkich komórkach,
- farmakokinetyka, biodystrybucja oraz toksyczność polielektrolitowych nanokapsułek w warunkach *in vivo* - badania na modelu mysim,
- analiza toksyczności oraz przeciwnowotworowej aktywności samoorganizujących się miceli alginianu sodu z kurkumina (AA-Cur).

Nanokapsułki polielektrolitowe zostały otrzymane przez zespół dr hab. Krzysztofa Szczepanowicza w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN w Krakowie. Jako polielektrolity używano poli-L-lizynę (PLL) i kwas poli-L-glutaminowy (PGA), a nanokapsułki wytwarzano metodą „warstwa po warstwie” (LbL, layer-by-layer), na drodze sekwencyjnej adsorpcji przeciwnie naładowanych polielektrolitów na hydrofobowym rdzeniu z emulsji, także stabilizowanym surfaktantem anionowym. Rdzeń tak wytworzonych nanokapsułek wykazuje charakter hydrofobowy i umożliwia enkapsulację leków trudno rozpuszczalnych w roztworach wodnych, takich jak często zalecany chemioterapeutyk – paklitaksel. Po stwierdzeniu internalizacji początkowo otrzymanych jedno - i dwuwarstwowych nanokapsułek z paklitaksellem przez komórki nowotworowe, dalsze badania Habilitantki objęły ocenę efektywności internalizacji dla dodatnio naładowanych nanokapsułek składających się z pięciu warstw polielektrolitów (NC5, zakończone warstwą PLL) i ujemnie naładowanych nanokapsułek zbudowanych z sześciu warstw polielektrolitów (NC6, zakończone warstwą PGA). Ponadto przedmiotem badań były nanokapsułki sześciowarstwowe, modyfikowane powierzchniowo na drodze kowalencyjnego przyłączenia glikolu polietylenowego (PEG, zakończone warstwą PEG). Ogólnie, PEGylacja powierzchni substancji dedykowanych do transportu leków jest efektywnym sposobem ograniczania ich szybkiego usuwania (klirensu) z organizmu. Analiza poboru nanokapsułek znakowanych fluorescencyjnie przy pomocy izotiocyjanianu fluoresceiny (FITC) przez komórki nowotworowe - komórki mysiego gruczołakoraka jelita grubego i komórki mysiego raka sutka – świadczy o kilkukrotnie wydajniejszej internalizacji dodatnio naładowanych NC5-FITC przez komórki w porównaniu do anionowych NC6-FITC lub neutralnych NC6-PEG-FITC z uwagi na oddziaływanie elektrostatyczne pomiędzy ujemnie naładowaną błoną plazmatyczną a nanocząstkami kationowymi. Wyniki badań przeprowadzonych przez dr Bzowską świadczą o pobieraniu nanocząstek przez komórki nowotworowe i zachowaniu aktywności enkapsulowanej w nich substancji czynnej. Z uwagi na dużą aktywność przeciwnowotworową kamptotecyny - związku naturalnego pochodzącego z kory *Camptotheca acuminata*, Habilitantka dokonała oceny toksyczności nanokapsułek i aktywności biologicznej kapsułek z kamptotecyną stosując dwie mysie linie komórek nowotworowych: CT26-CEA i 4T1. Potwierdziła, że wolna lub zamknięta w nanokapsułkach kamptotecyna indukowała w stosowanych komórkach nowotworowych zahamowanie progresji cyklu komórkowego w fazie G2/M, a więc kamptotecyna ulokowana w nanokapsułkach zachowuje swą aktywność biologiczną.

W następnym etapie badań dr Monika Bzowska analizowała toksyczność pustych nanokapsułek w warunkach *in vitro* poprzez ocenę hematotoksyczności, immunotoksyczności (prozapalnej aktywności) oraz oksydacyjnej aktywności, stwierdzając, że ekspozycja wybranych komórek na działanie nanokapsułek nie skutkowało aktywacją NF- $\kappa$ B (ang. Nuclear factor  $\kappa$ B), stanowiącego najistotniejszy czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję białek związanych ze stanem zapalnym. Badania nanokapsułek w celu określenia stymulacji stresu oksydacyjnego, wyrażonego nadprodukcją reaktywnych form tlenu (ROS), w modelowych komórkach HepG2 (ang. liver hepatocellular carcinoma) wykazały brak wzrostu poziomu ROS, natomiast wyniki analizy uszkodzeń DNA świadczą, że badane nanokapsułki nie wykazują aktywności genotoksycznej. W świetle przeprowadzonej analizy w warunkach *in vitro* i stwierdzenia, że nanokapsułki polielektrolitowe NC6 oraz NC-PEG nie są toksyczne dla wybranych ludzkich i mysich komórek, Kandydatka przedstawiła charakterystykę *in vivo* nanokapsułek na modelu mysim (myszy szczepu Balb/C). Analiza farmakokinetyki, biodystrybucji oraz dróg eliminacji nanokapsułek znakowanych fluorescencyjnie wykazała, że NC-PGA oraz NC-PEG mają bardzo zbliżone profile farmakokinetyczne i po podaniu dożylnym wykrywalne są w osoczu, wątrobie, nerkach i śledzionie jeszcze po czterech godzinach, a następnie są stopniowo eliminowane z wraz z żółcią i moczem. Otwiera to nowe możliwości wykorzystania funkcjonalizowanego PGA do zastosowań biomedycznych, obok powszechnie stosowanego PEG. Analiza toksyczności nanokapsułek w dwóch schematach podawania dożylnego (do 60 dni od ostatniego podania) nie wykazała hematotoksycznego działania stosowanych form podawania leku. Aktywność wybranych enzymów wątrobowych i stężenie poszczególnych osoczowych markerów hepatotoksyczności i nefrotoksyczności były także prawidłowe, a analiza histopatologiczna potwierdziła brak uszkodzenia narządów.

W toku dalszych prac Habilitantka skupiła się na analizie toksyczności i aktywności przeciwnowotworowej samoorganizujących się miceli alginianu sodu z kurkumina (AA-Cur). Kurkumina - naturalny polifenol pochodzącym z kłącza ostryżu długiego, jest wykorzystywana dla leczenia wielu chorób, w tym chorób neurodegeneracyjnych i nowotworowych. Ważną kwestię stanowi opracowanie i scharakteryzowanie efektywnych systemów kapsułkowania słabo rozpuszczalnej w wodzie kurkuminy, takich jak liposomy, nanocząstki polimerowe i micelle polimerowe; przykładem takiego układu są kompleksy alginianu sodu z kurkumina (AA-Cur), które wykazują zdolność do samoorganizacji, tworząc micelle o rozmiarze ok. 150 nm. Z uwagi na fakt, że alginian sodu jest bardzo dobrze rozpuszczalny w wodzie, można otrzymywać roztwory o

znacznym stężeniu kurkuminy. Otrzymane przez dr hab. Annę Karewicz z Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego i dr Dorotę Lachowicz z Akademickiego Centrum Materiałów i Nanotechnologii Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie preparaty zostały poddane przez dr Bzowską badaniom toksyczności oraz aktywności przeciwnowotworowej *in vivo*. Przeprowadzone analizy morfologii krwi nie wykazały zmian u myszy, którym podawano dożylnie koniugat AA-Cur w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi; nie wykryto uszkodzenia DNA w komórkach wyizolowanych ze szpiku kostnego zwierząt, jak również uszkodzeń nerek, wątroby ani śledziony. Kandydatka określiła także immunomodulujące właściwości AA-Cur poprzez analizę stężenia najważniejszych cytokin w surowicach myszy. W celu dokonania oceny potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej koniugatu, dr Bzowska podawała dożylnie AA-Cur myszom, którym uprzednio podała komórki raka okrężnicy lub komórki raka sutka. W obu modelach nowotworowych średnie masy guzów u myszy leczonych AA-Cur były o ponad 30% niższe niż u myszy kontrolnych, przy czym zmiany wielkości guzów nie osiągnęły istotności statystycznej. Uzyskane przez Habilitantkę wyniki mogą być wykorzystane przy projektowaniu nowych formułacji zawierających kurkuminę, kompatybilnych z innymi związkami czynnymi.

Podsumowując ocenę osiągnięcia naukowego dr Moniki Bzowskiej pt. „Biologiczna charakterystyka nanomateriałów: polielektrolitowych nanokapsulek oraz samoorganizujących się miceli alginianu sodu z kurkuminą pod kątem ich wykorzystania w nanomedycynie” stwierdzam, że w opinii recenzenta stanowi ono znaczny wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne. Prawidłowo zaplanowane prace badawcze w zakresie sporządzenia charakterystyki biologicznej nanomateriałów - polielektrolitowych nanokapsulek oraz samoorganizujących się miceli alginianu sodu z kurkuminą, pod kątem ich wykorzystania w nanomedycynie, pozwoliły Habilitantce na otrzymanie poprawnie omówionych i spójnie przedstawionych wyników o charakterze poznawczym.

#### Ocena istotnej aktywności naukowej

Aktywność naukowa dr Moniki Bzowskiej jest również realizowana w więcej niż jednej uczelni lub instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej. Habilitantka odbyła staże w zagranicznych jednostkach naukowych - staż naukowy w Centrum Badań Biomedycznych Uniwersytetu Glasgow (14.02-14.08.2007) miał na celu praktyczne

oprowadzenie wytwarzania przeciwciał monoklonalnych z zastosowaniem technologii ekspresji fagowej. Co ważne, pozyskana w czasie stażu wiedza została wykorzystana przez dr Bzowską przy przygotowaniu dwóch publikacji naukowych oraz dwóch patentów. Staż naukowy w Instytucie Inżynierii Chemicznej i Bioinżynierii Politechniki Federalnej w Zurychu ETHZ (13.01-13.04.2017) ukierunkowany był na pozyskanie wiedzy w zakresie produkcji ludzkich przeciwciał monoklonalnych w bioreaktorach i skutkowało powstaniem wspólnej publikacji naukowej z zespołem z ETHZ. Habilitantka od 2012r. ściśle współpracuje z Instytutem Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk w Krakowie (IKFP PAN) w zakresie badań biologicznych nanokapsułek polielektrolitowych otrzymywanych w IKFP PAN; uzyskane wyniki stanowią osiągnięcie naukowe będące podstawą habilitacji dr Bzowskiej. W wyniku współpracy powstało 11 publikacji naukowych. Kandydatka współpracuje również z Akademickim Centrum Materiałów i Nanotechnologii na Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie w obszarze charakteryzowania biologicznego samoorganizujących się miceli alginianu sodu z kurkuminą - otrzymane wyniki wchodzi w skład osiągnięcia naukowego będącego podstawą habilitacji dr Moniki Bzowskiej. Habilitantka współpracuje z jednostkami naukowymi z zagranicy - Institute of Nanoscience and Materials of Aragon University of Zaragoza, National Center for Scientific Research in France – CNRS Paris Descartes University, National Center for Scientific Research in France – CNRS Paris oraz University of Mons i Physikalisch-Technische Bundesanstalt (Niemcy) przy przygotowaniu projektów międzynarodowych. Działalność naukowa dr Bzowskiej została doceniona poprzez przyznanie nagrody zespołowej Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego za szczególne osiągnięcia naukowe w 2019r.

Ocena istotnej aktywności naukowej dr Moniki Bzowskiej jest w pozytywna.

#### Ocena działalności dydaktycznej, organizacyjnej i popularyzującej naukę

Dr Bzowska prowadziła zajęcia praktyczne z przedmiotu „Przeciwciała monoklonalne” dla studentów kierunku Biotechnologia na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz przedmiotu „Monoclonal antibodies” dla studentów zagranicznych studiujących na macierzystym Wydziale w ramach programów ERASMUS oraz dla studentów kierunku „Molecular Biotechnology”. Prowadziła również zajęcia w ramach m.in. przedmiotów „Biochemia cyklu

komórkowego”, „Biochemia zaawansowana”, „Sygnalizacja komórkowa” i „Genetyka molekularna”. Była promotorem 11 prac dyplomowych magisterskich i 12 prac dyplomowych licencjackich. Dr Bzowska sprawowała opiekę naukową nad trojgiem studentów – stypendystów Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wybitne osiągnięcia, z których jedna studentka była również beneficjentką programu „Diamantowy Grant”. Recenzowała ponad 20 prac dyplomowych. Od 2016r. pełni funkcję promotora pomocniczego w jednym otwartym przewodzie doktorskim. W 2011r. otrzymała nagrodę II stopnia Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego za szczególne osiągnięcia naukowe i dydaktyczne.

Dr Monika Bzowska recenzowała prace złożone do redakcji czasopism naukowych, w tym Scientific Reports (Springer), International Journal of Nanomedicine (DOVE Medical Press) i ACS Applied Materials & Interfaces (ACS). Szkoliła pracowników Działu Produkcji Odczynników Serologicznych, Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Katowicach i pracowników firmy BioScientia sp. z o.o. w Poznaniu oraz kierowała badaniami zleconymi w zakresie produkcji przeciwciał monoklonalnych. Była kierownikiem projektu badawczego finansowanego przez Komitet Badań Naukowych oraz wykonawcą w projektach m.in. Marie Curie Actions, Sonata i Innotech. Pełni funkcję sekretarza Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki.

Habilitantka prowadziła działania na rzecz popularyzacji nauki, m.in. poprzez opracowanie i wygłaszanie wykładu pt. „Przeciwciała monoklonalne w biotechnologii i medycynie” w ramach corocznego cyklu „Spotkania w samo południe u biotechnologów” na macierzystym Wydziale, jak również prowadziła warsztaty dla licealistów „Przeciwciała monoklonalne w oznaczaniu grup krwi” w ramach cyklu „Spotkania w samo popołudnie z biochemią, biofizyką i biotechnologią”. Dr Bzowska prowadziła również zajęcia z dziećmi zatytułowane „Dlaczego krew to nie woda?” w ramach Uniwersytetu Dzieci w Krakowie oraz warsztaty podczas „Nocy naukowców” i w ramach cyklu: Life science dla licealistów.

Działalność organizacyjna Kandydatki obejmuje członkostwo w Radzie Wydziału Biochemii Biofizyki i Biotechnologii UJ jako reprezentanta nauczycieli akademickich nieposiadających tytułu naukowego lub stopnia doktora habilitowanego, w Wydziałowej Komisji do Spraw Jakości Kształcenia, w Radzie Programowej Kierunku Biochemia, w Wydziałowej Komisji Egzaminacyjnej oraz w Radzie Programowej Klastra Life Science w Krakowie.

Ocena działalności zawodowej dr Moniki Bzowskiej w zakresie działalności naukowej, dydaktycznej i organizacyjnej jest pozytywna. Zawarte w przedstawionym jako osiągnięcie naukowe cyklu publikacji pt. „Biologiczna charakterystyka nanomateriałów: polielektrolitowych nanokapsułek oraz samoorganizujących się miceli alginianu sodu z kurkumina pod kątem ich wykorzystania w nanomedycynie” wyniki stanowią oryginalny i znaczny wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne. Dr Bzowska m.in. dokonała oceny toksyczności polielektrolitowych nanokapsułek w warunkach *in vitro* na wybranych mysich i ludzkich komórkach, jak również dokonała analizy farmakokinetyki, biodystrybucji oraz oceny toksyczności polielektrolitowych nanokapsułek w warunkach *in vivo* (badania na modelu mysim). Habilitantka jest współautorką szeregu publikacji naukowych w uznanych czasopismach, współtwórcą patentów oraz aktywnie uczestniczy w krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Osiągnięcia naukowe Habilitantki odpowiadają wymaganiom określonym w art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce - wnoszę zatem do Komisji Habilitacyjnej o pozytywne rozpatrzenie i dalsze procedowanie wniosku o nadanie dr Monice Bzowskiej stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.



Kraków, 25.09.2022r.