

R E C E N Z J A

rozprawy doktorskiej zatytułowanej

**Lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne jako potencjalne systemy
do obrazowania i dostarczania leków**

wykonanej i napisanej przez mgr inż. Jakuba Jagielskiego

Recenzja została przygotowana na podstawie uchwały Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne i Astronomia Wydziału Fizyki UAM, z dnia 7 lipca 2023 r., powołującej mnie na recenzenta niniejszej pracy.

Podstawą prawną do przygotowania recenzji jest art. 187 Ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dnia 20 lipca 2018 roku.

Podstawa prawna przeprowadzenia doktoratu opartego na monografii naukowej jest zawarta w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku, która dopuszcza rozprawę w formie pracy pisemnej.

Otrzymana do recenzji rozprawa doktorska, pod wyżej wymienionym tytułem, napisana w języku polskim, jest poświęcona badaniom właściwości lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych, które mogą być wykorzystane jako potencjalne systemy do obrazowania tkanek oraz dostarczania leków. Praca została wykonana w Centrum NanoBioMedycznym na Wydziale Fizyki UAM, pod kierunkiem dr hab. Jakuba Pochylskiego jako promotora oraz dr Grzegorza Nowaczyka jako promotora pomocniczego, w ramach grantu Sonata Bis 6 Narodowego Centrum Nauki pt: „Kubosomy – nanocząstki ciekłokrystaliczne jako potencjalne systemy do bioobrazowania” UMO-2016/22/E/ST3/00458.

Omówienie rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa liczy 179 jednostronnie zadrukowanych stron. Strony 4-5 to spis treści zawierający nazwy rozdziałów oraz podrozdziałów, na stronach 6-7 jest podany po angielsku i po polsku wykaz skrótów użytych w monografii. Na stronach od 8 do 13 Doktorant przygotował spis 109 rycin a na stronie 14 jest spis treści 19 tabel wykorzystanych

w monografii. Cztery kolejne strony zajmuje Wstęp, a na stronach od 19 do 70 znajduje się rozdział zatytułowany Wstęp teoretyczny. Na stronie 71 omówione są cele rozprawy a na stronach od 72 do 82 zastosowane metody badawcze oraz użyte materiały. Strony od 83 do 155 zajmują omówienie wyników oraz dyskusja a po nich następuje trzystronicowe przedstawienie wniosków. Rozprawę kończy pięciostronicowy spis literatury zawierający 300 pozycji.

Ocena merytoryczna rozprawy

Szeroko pojęty rozwój cywilizacyjny niesie za sobą doskonalenie metod diagnostycznych a co za tym idzie, między innymi, wzrost wykrywalności chorób nowotworowych. Odpowiedzią na te wyzwania jest równoległe obserwowany dynamiczny rozwój nanobioinżynierii, prowadzący do tworzenia coraz bardziej zaawansowanych strukturalnie leków, które mogą jednocześnie spełniać funkcje diagnostyczne oraz terapeutyczne i które uzyskały nazwę narzędzi teranostycznych. Duża różnorodność powstających struktur lekowych jest związana z rozwojem terapii celowanych tj. dostarczeniu leku bezpośrednio do komórki u określonego pacjenta. Obecnie są to struktury metaliczne lub polimerowe. Te ostatnie, tzw. miękkie nośniki, zawierają liposomy, rurki węglowe, kropki kwantowe, dendrimery oraz szereg innych struktur. Obecnie do jednych z najpopularniejszych nośników należą kubosomy, samoorganizujące się struktury ciekłokrystalicznych lipidowych nanocząstek w obecności specyficznych surfaktantów. Dzięki swoistej budowie oraz właściwościom fizyko-chemicznym mogą one być nośnikami leków lub barwników komórkowych.

Wszystkie wyżej wspomniane zagadnienia stały się zapewne podstawą do przygotowania recenzowanej rozprawy. Zadania, które postawili przed sobą Doktorant oraz jego Promotor są w pełni uzasadnione zarówno ze względów poznawczych jak i aplikacyjnych a przedstawiona tematyka dysertacji znajduje się w nurcie aktualnych i oryginalnych zagadnień badawczych. Należy podkreślić, że recenzowana praca ma charakter interdyscyplinarny łącząc w sposób twórczy zagadnienia z inżynierii materiałowej oraz biologii molekularnej.

Doktorant w swoich badaniach zastosował szereg zaawansowanych, nowoczesnych technik pomiarowych, pozwalających na uzyskiwanie wzajemnie dopełniających się informacji, dzięki czemu zwiększyła się wiarygodność i dokładność prowadzonych badań. Zastosowane metody badawcze to: spektroskopia absorpcyjna (UV-Vis), konfokalna skaningowa mikroskopia laserowa, dynamiczne rozpraszanie światła (DLS), kriogeniczna transmisyjna mikroskopia

elektronowa (cryo-TEM) i rozpraszanie rentgenowskie pod małymi kątami (SAXS). W świetle postawionych celów badawczych wybór metod pomiarowych jest uzasadniony i adekwatny. Do oceny toksyczności nowo zsyntetyzowanych lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych Doktorant zastosował szereg testów biologii molekularnej, które jednocześnie potwierdziły jego dużą wiedzę oraz umiejętności w tej dziedzinie. Celem optymalizacji części pomiarów Doktorant wykorzystał metody z zakresu projektowania doświadczeń dzięki czemu mógł uzyskać pełniejszy pogląd na badane zależności.

Wstęp do pracy, oparty na wynikach piśmiennictwa światowego, jest dość syntetyczny, niemniej jednak wystarczająco wprowadza recenzenta w problematykę dotyczącą zagadnień podjętych w rozprawie.

Część teoretyczna, oparta na danych literaturowych, jest bardzo rozbudowana gdyż Doktorant charakteryzuje w niej materiały użyte do badań. Omawia właściwości wytworzonych przez siebie struktur wraz z pełnymi charakterystykami wykresów fazowych dla badanych układów ciekłokrystalicznych, omawia ich funkcje w komórce oraz ich cytotoksyczność. Dużo uwagi poświęcił metodom wytwarzania lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych wskazując zalety i wady metod „bottom-up” oraz „top-down”. Następnie opisuje wszystkie wykorzystane w pracy metody fizyczne, wraz z teorią na których one są oparte, jak również zasady działania użytych przyrządów pomiarowych. W mojej ocenie w dużej mierze jest to elementarna wiedza podręcznikowa i ta część mogłaby być zdecydowanie krótsza. Jednakowoż zapoznanie się z tak przedstawioną informacją pozwala stwierdzić, że Doktorant zna potrzebne techniki badawcze jak również literaturę naukową w zakresie swoich zainteresowań co pozwala mu na świadomy wybór zagadnień oraz metodyki zaplanowanych badań. Świadczy o tym również dogłębny opis procedur wytwarzania lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych oraz analiza ich właściwości cytotoksycznych i antybakteryjnych.

Cel pracy okazał się być podwójny. Pierwszy poświęcony był ocenie użyteczności lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych, opartych na monooleinianie glicerolu oraz fitantriolu, stabilizowanych surfaktantem PluronicF127, jako potencjalnych systemów do bioobrazowania i dostarczania leków. Realizacja tego celu odbyła się poprzez wypełnienie opisanych zadań szczegółowych. Drugim celem pracy było uzyskanie nowych, stabilnych układów lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych opartych na monooleinianie glicerolu, domieszkowanego monolaurynianem glicerolu oraz określenie ich właściwości antybakteryjnych. Realizacja tego celu odbyła się poprzez wykonanie czterech opisanych zadań szczegółowych.

Omówienie uzyskanych wyników zostało przedstawione w rozdziale Wyniki i dyskusja. Po zapoznaniu się z materiałem z tego rozdziału mogę stwierdzić, że zakładane cele badań, omówione powyżej, zostały osiągnięte. Ponadto Doktorant uzyskał szereg ciekawych wyników, które pozwalają na wyciągnięcie interesujących wniosków zarówno w zakresie stabilizacji struktur jak i oceny ich właściwości cytotoksycznych oraz antybakteryjnych.

Oceniając całokształt pracy trzeba wskazać na szeroki zakres zagadnień towarzyszących każdemu zadaniu badawczemu, omówienie uzyskanych wyników oraz ich analizę w świetle innych danych literaturowych. Kolejnym osiągnięciem Doktoranta jest umiejętność zastosowania metod projektowania doświadczeń do przeprowadzenia odpowiednich eksperymentów w celu skutecznej oceny wpływu pojedynczych czynników na badany parametr.

Za najcenniejsze i najważniejsze osiągnięcia Doktoranta przedstawione w niniejszej rozprawie uważam:

1. Określenie optymalnych warunków syntezy nowych układów lipidowych nanocząsteczek ciekłokrystalicznych opartych na monooleinie glicerolu oraz fitantriolu stabilizowanych surfaktantem Pluronic F127, które po odpowiedniej modyfikacjach mogą być użyte na szerszą skalę w laboratoriach farmaceutycznych lub związanych z przemysłem spożywczym. Otrzymane struktury charakteryzują się większą stabilnością w porównaniu z innymi strukturami opartymi na monooleinie glicerolu.
2. Wykazanie, że lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne oparte na fitantriolu mają znacznie wyższą cytotoksyczność w porównaniu do tych opartych na monooleinie glicerolu w stosunku do obydwu badanych linii komórkowych.
3. Zastosowanie metod teorii pomiarów do optymalizacji warunków syntezy nowych układów lipidowych dające oszczędności związane z czasem pomiarów, ilością odczynników oraz odkrycie ewentualnych interakcji pomiędzy składnikami.
4. Ze względu na obszerne opisy zastosowanych metod oraz protokołów rozprawa może służyć jako przewodnik dla przyszłych badaczy zajmujących się podobną tematyką.

Zadanie recenzenta to również wskazanie uchybień i niejasności w przedstawionej dysertacji. W tekście występują nieliczne błędy literowe, razem znalazłem kilka. Natomiast dużym uchybieniem jest brak angielskich wersji dotyczących opisu rycin oraz tabel. Dotyczy to

również braku angielskich podpisów pod rysunkami oraz tytułami tabel. Podobnie sytuacja przedstawia się jeżeli chodzi o podsumowanie oraz wnioski. Rozumiem, że przedstawione wyniki będą wkrótce opublikowane w anglojęzycznych czasopiśmie i tam będą już zaprezentowane w języku angielskim.

Ponadto mam też kilka pytań dotyczących części eksperymentalnej oraz uzyskanych wyników:

- czy tekst na str. 158 to abstrakt czy dalsza część Wniosków?
- wśród 300 prac nie znalazłem żadnej autorstwa Doktoranta. Jak jest tego przyczyna?
- Doktorant używa wyrażenia 20% masowych lipidu, co to oznacza?
- proszę aby Doktorant wskazał i wyjaśnił, które osiągnięcie uważa za najważniejsze
- czy jest możliwe przeprowadzenie pomiarów rentgenowskich w celu uzyskania trójwymiarowej struktury wytwarzanych kubosomów?
- wybór zastosowanych kultur tkankowych Doktorant podał w opisie. Czy efekty działania, obserwowane w wyniku stosowania badanych struktur na komórki HeLa oraz MSU 1.1 będą podobne gdy zastosujemy inny rodzaj linii komórkowych, bardziej lub mniej czułych na obecność badanych struktur lipidowych?
- czy jest możliwe dołączenie leków do uzyskanych struktur lipidowych w celu uzyskania celowanych leków o podwyższonej skuteczności?

Uwagi powyższe oraz pytania nie mają wpływu na merytoryczną ocenę pracy i mają charakter dyskusji. Mam nadzieję, że wyjaśnienia i odpowiedzi na powyższe pytania zostaną udzielone przez Doktoranta podczas publicznej obrony.

Uważam, że w świetle obowiązujących przepisów, Ustawa z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce wraz z uzupełnieniami, przedstawiona rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie Pana mgr inż. Jakuba Jagielskiego do dalszych etapów postępowania celem uzyskania stopnia doktora nauk fizycznych w dyscyplinie nauki fizyczne i astronomia.

Praca jest dobrze napisana tak na poziomie merytorycznym jak i interpretacyjnym, doskonale wpisując się w tematykę Centrum Nanobiomedycznego, gdzie powstała. Szeroki zakres metod pomiarowych zastosowanych podczas realizacji poszczególnych celów oraz dogłębna analiza uzyskanych wyników pozwoliły Doktorantowi na całościową ocenę mechanizmów działania

wytworzonych struktur lipidowych zarówno na poziomie molekularnych jak i komórkowym. Biorąc pod uwagę wyżej przedstawione argumenty oraz ze względu na to, że oceniana dysertacja ma charakter innowacyjny i interdyscyplinarny łącząc zagadnienia z dziedzin inżynierii materiałowej, biologii, nanotoksykologii i statystyki oraz posiada wysoki potencjał aplikacyjny, wnoszę o jej wyróżnienie.