

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Jakuba Jagielskiego

pt. „Lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne jako potencjalne systemy do obrazowania i dostarczania leków”

wykonanej w Centrum NanoBioMedycznym Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Mikołaja Pochylskiego, prof. UAM oraz promotora pomocniczego dr Grzegorza Nowaczyka

Nośniki to rodzaj materiałów lub technologii, które posiadają niezwykle ważne zadanie w różnych dziedzinach życia. Nośniki można zdefiniować jako substancje lub materiały, które służą do przenoszenia, przechowywania i dostarczania różnych rodzajów informacji, energii czy substancji chemicznych. Rodzajem nośników, bez których w dzisiejszych czasach nie potrafimy żyć to nośniki pamięci. Są to urządzenia lub materiały, które służą do zapisywania i przechowywania danych. Przykłady takich nośników obejmują dyski twarde, pendrive'y, karty pamięci oraz chmurę obliczeniową. Kolejnym istotnym rodzajem nośników są nośniki energii. Są to substancje lub materiały, które pozwalają przechowywać energię w różnych formach i dostarczać ją w odpowiednim momencie. Przykłady to baterie, akumulatory, zbiorniki gazowe oraz magazyny energii. Wydaje się, że będą one miały kluczowe znaczenie dla życia na Ziemi w nadchodzących dekadach. Innym przykładem nośników są substancje chemiczne zdolne do dostarczania substancji leczniczych do organizmu pacjenta. Nośnik leku służy do transportu, przechowywania i kontrolowanego uwalniania leku w organizmie. Rozróżnia się kilka rodzajów nośników leków, różniących się charakterem chemicznym nośnika. Wśród nich są nośniki nieorganiczne, które są zwykle oparte na materiałach nieorganicznych, takich jak nanocząstki metaliczne lub krzemionka. Mogą być wykorzystywane w celu zwiększenia stabilności i kontrolowanego uwalniania leków. Istnieją również nośniki hybrydowe, które łączą w sobie zarówno komponenty organiczne, jak i nieorganiczne. Przykładem są nanocząstki zawierające organiczne powłoki na bazie

nieorganicznych rdzeni. Kolejną grupę stanowią nośniki biomimetyczne, których budowa jest podobna do naturalnych biostruktur, takich jak białka lub cząsteczki DNA. Te nośniki mogą być wykorzystywane do dostarczania leków w sposób bardzo precyzyjny. Największą grupę stanowią nośniki organiczne, które składają się z organicznych związków chemicznych, takich jak lipidy (np. liposomy lub lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne - LLCPNs), polimerowe mikroglobule lub mikrokapsułki itd. Dzięki swojej budowie, liposomy czy lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne mogą być używane do dostarczania leków tam, gdzie są one potrzebne, zwiększając skuteczność terapii i minimalizując skutki uboczne. To właśnie te struktury nośnikowe stały się obiektem badań mgr inż. Jakuba Jagielskiego.

Recenzowana rozprawa doktorska posiada układ typowy dla prac eksperymentalnych z zakresu nauk ścisłych i przyrodniczych. Całość rozprawy obejmuje 179 stron maszynopisu i podzielona jest na 6 głównych rozdziałów (tj. wstęp teoretyczny, cele pracy, część eksperymentalna, wyniki i dyskusje, wnioski oraz bibliografia). Rozdziały te poprzedza wykaz skrótów i oznaczeń stosowanych w pracy, natomiast na końcu pracy znajduje się aneks w postaci wykresów dotyczących średniej żywotności komórek wobec badanych układów. W pracy umieszczono kilkanaście tabel, kolorowych rysunków, wzorów, wykresów oraz zdjęć, które znacznie ułatwiły zrozumienie przedstawionych wyników. Spis piśmiennictwa obejmuje 284 pozycje a większość z nich to odniesienia do publikacji z ostatnich dziesięciu lat, co świadczy o tym, że podjęty przez Doktoranta temat pracy doktorskiej jest nowatorski oraz cieszy się bardzo dużym zainteresowaniem. Praca doktorska napisana jest w języku polskim, w sposób poprawny i przystępny. W pracy znalazłam drobne niedociągnięcia stylistyczne, ale nie miały one wpływu na pełne zrozumienie treści rozprawy. W mojej opinii rozdział dotyczący części eksperymentalnej oraz wyników i wniosków powinien być napisany w pierwszej osobie, gdyż wszystkie eksperymenty były wykonywane osobiście przez Doktoranta. Pod względem edycyjnym praca doktorska została przygotowana bardzo starannie. Uwagę zwracają również podziękowania, skierowane między innymi do śp. prof. Jurgi, który umożliwił Doktorantowi realizację bardzo ciekawej tematyki pracy doktorskiej w Centrum NanoBioMedycznym.

Rozdział pierwszy, zatytułowany „Wstęp teoretyczny” to bogaty i bardzo szczegółowy opis lipidów zarówno od strony ich właściwości fizykochemicznych jak i biologicznych. Doktorant opisał we wstępie w jaki sposób lipidy ulegają samoorganizacji oraz podał warunki powstawania lipidowych fazy kubicznych. Szczególnie interesująca jest charakterystyka faz ciekłokrystalicznych oraz opis zależności między wartością krytycznego parametru upakowania (CPP), powstającą strukturą cząsteczki amfifilowej i tworzonej fazy ciekłokrystalicznej. W zależności od wartości parametru CPP lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne tworzą różnorodne trójwymiarowe regularne struktury w przestrzeni. Interesujący jest również opis sposobów wytwarzania LLCPNs. Pan Jagielski opisał także bardzo szczegółowo budowę i funkcje lipidów i surfaktantów, które wykorzystał w swojej pracy eksperymentalnej do utworzenia lipidowych nanocząstek

cieklotkrystalicznych. Należą do nich monooleinian glicerolu (GMO), fitantriol (PHT), monolaurynian glicerolu (GML) oraz pluronik F127 (F127), znany pod nazwą Poloksamer 407. Dodatkowo, Kandydat opisał również funkcje biologiczne jakie spełniają lipidy oraz ich fazy cieklotkrystaliczne w żywej komórce. Kolejne podrozdziały to opis podstaw teoretycznych metod służących do charakterystyki fizykochemicznej LLCPNs oraz metod wykorzystywanych do opisu cytotoksyczności i genotoksyczności nanocząstek cieklotkrystalicznych. Należą do nich: dynamiczne rozpraszanie światła (DLS), elektroforetyczne rozpraszanie światła (ELS), transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM), małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (SAXS), spektrofotometria absorpcyjna (UV-Vis), konfokalna skaningowa mikroskopia laserowa oraz pomiar poziomu ekspresji genów. Z wielkim zainteresowaniem przeczytałam rozdział dotyczący sposobu optymalizacji warunków syntezy LLCPNs, wykorzystujący dwupoziomowy plan czynnikowy, rozszerzony do centralnego planu kompozycyjnego. Pełen dwupoziomowy plan czynnikowy pozwala na uzyskanie informacji na temat wpływu kontrolowanych czynników (np. średnia hydrodynamiczna, współczynnik polidispersji, ładunek powierzchniowy czy stabilność układu w czasie) na mierzone wielkości oraz określenie obecności ewentualnych oddziaływań zachodzących pomiędzy tymi czynnikami. Doktorant wykorzystał tę metodę podczas optymalizacji składu badanych przez niego LLCPNs zbudowanych z GMO i GML domieszkowanych F127. Należy podkreślić, że materiał zawarty we wstępie teoretycznym jest poparty bogatą literaturą naukową (176 odnośników literaturowych) oraz licznymi przykładami. Pokazuje również doskonałe przygotowanie teoretyczne Doktoranta w zakresie obiektów badawczych jak i metod eksperymentalnych wykorzystanych w pracy doktorskiej.

Lektura wstępu teoretycznego pracy doktorskiej mgr inż. Jagielskiego pokazała, że LLCPNs to nanocząstki które mogą być świetnymi nośnikami leków ale ich potencjalne zastosowanie ściśle zależy od ich składu i właściwości fizykochemicznych. Dlatego, Kandydat postanowił zbudować trzy rodzaje LLCPNs (GMO, PHT oraz GMO/GML) a następnie zbadać ich właściwości fizykochemiczne, ocenić ich bezpieczeństwo wobec ludzkich komórek i określić właściwości antybakteryjne (jedynie dla GMO/GML). W tym miejscu pragnę zapytać Doktoranta, skąd padł wybór na te a nie inne komórki? Pan Jagielski postawił sobie dwa główne cele badawcze do których należały: (i) **określenie użyteczności lipidowych nanocząstek cieklotkrystalicznych zbudowanych z monooleinianu glicerolu lub fitantriolu**, stabilizowanych surfaktantem Pluronic F127 oraz (ii) **określenie właściwości antybakteryjnych dla nowych układów lipidowych nanocząstek cieklotkrystalicznych zbudowanych z monooleinianu glicerolu domieszkowanego monolaurynianem glicerolu**, posiadającym właściwości przeciwbakteryjne.

Następny rozdział pracy doktorskiej, zatytułowany „Synteza i analiza właściwości cytotoksycznych lipidowych nanocząstek cieklotkrystalicznych”, został przez Doktoranta podzielony na sześć głównych podrozdziałów, w których wymienił zastosowane przez siebie materiały. Następnie mgr inż. Jagielski opisał wszystkie stosowane przez siebie metody fizykochemiczne i

biologiczne wraz z opisami przeprowadzonych eksperymentów. Należały do nich, w dużym uproszczeniu: (i) opis wytwarzania i optymalizacji lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych; (ii) dynamiczne rozpraszanie światła (DLS); (iii) kriogeniczna transmisyjna mikroskopia elektronowa (cryo-TEM); (iv) rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego pod małymi kątami (SAXS); (v) test proliferacji komórkowej WST-1 dla linii komórkowych HeLa oraz MSU 1.1; (vi) analiza wewnątrzkomórkowego wytwarzania reaktywnych form tlenu; (vii) analiza integralności cytoszkieletu; (viii) analiza ekspresji genów wpływających na integralność cytoszkieletu oraz na właściwości proliferacyjne; (ix) analiza ścieżek internalizacji; (x) badania antybakteryjne. Warto zaznaczyć, że wszystkie badania zostały wykonane samodzielnie przez Doktoranta w tym również badania biologiczne. Pan Jagielski zdobył wykształcenie przyrodnicze na wczesnych etapach swojej kariery naukowej, co z pewnością ułatwiło mu wykonanie badań biologicznych.

W kolejnym podrozdziale zatytułowanym „Wyniki i dyskusja” Doktorant przedstawił wyniki badań w dwóch głównych rozdziałach. Pierwszy z nich opisuje wytwarzanie oraz właściwości fizykochemiczne LLCNPs, natomiast drugi podrozdział zawiera wyniki badań biologicznych. W pierwszym podrozdziale Doktorant scharakteryzował w pierwszej kolejności lipidowe nanocząstki ciekłokrystaliczne zbudowane z 2% lub 20% masowych lipidu GMO lub PHT a następnie w taki sam sposób zbadał układ GMO/GML. Dla wszystkich rodzajów LLCNPs wykonał pomiary, które umożliwiły mu określenie następujących parametrów: stabilność układów LLCNPs w czasie, ładunek powierzchniowy nanocząstki oraz struktura krystaliczna LLCNPs. Okazało się, że wytworzone przez Doktoranta LLCNPs są stabilne, struktura krystaliczna dla GMO przybiera symetrię Pn3m, zaś dla PHT symetrię Pn3m i lamelarną. W przypadku układu GMO/GML struktura krystaliczna zależy od proporcji składu GMO względem GML i F127 oraz od temperatury, przybierając głównie symetrię Pn3m. Uzyskane przez Doktoranta wyniki wskazują, że struktury zbudowane z GMO są większe i luźniej upakowane niż zawierające PHT, co czyni je potencjalnie lepszymi nośnikami leków. Obrazy cryo-TEM dla badanych układów LLCNPs pokazują, że tworzą one struktury kubiczne i heksagonalne z domieszką liposomów. Niestety trudno jest mi zidentyfikować liposomy na zdjęciach cryo-TEM. Proszę o pokazanie, podczas publicznej obrony, przykładowego zdjęcia cryo-TEM z zaznaczonymi liposomami, strukturami kubicznymi i heksagonalnymi. Na szczególną pochwałę zasługują przeprowadzone przez Doktoranta badania dotyczące optymalizacji składu LLCNPs dla układu GMO/GML/F127. Doktorant zastosował dwupoziomowy plan czynnikowy i centralny plan kompozycyjny do ustalenia najlepszego i najbardziej stabilnego składu LLCNPs zawierającego dodatek 3,5% całkowitej masy lipidów GML.

W drugiej części rozdziału „Wyniki i dyskusja”, Doktorant opisał uzyskane wyniki badań biologicznych, z których wynika, że układy LLCNPs zbudowane z fitantriolu (PHT) są bardziej cytotoksyczne względem linii komórkowych HeLa oraz MSU 1.1 niż te zbudowane z monooleinianu glicerolu (GMO). Wyższa cytotoksyczność nanocząstek PHT może wynikać z destabilizacji równowagi błony komórkowej, mogącej prowadzić do nieprawidłowości w

organizacji cytoszkieletu komórki. Dodatkowo układ PHT powodował zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu oraz wykazywał tendencję do obniżonej ekspresji genów ACTB, CDK1 i DHFR w porównaniu do LLCNPs zbudowanych z GMO. Wyniki badań biologicznych wskazują, że lepszymi nanocząstkami lipidowymi do przenoszenia leków są te zbudowane z GMO. Badania komórkowe przeprowadzone dla LLCNPs zbudowanych z GMO/GML pokazują, że nie wykazują one zasadniczych różnic z wynikami uzyskanymi dla LLCNPs GMO. Doktorant badał również sposób internalizacji LLCNPs w komórkach. Okazuje się, że w zależności od stężenia i składu LLCNPs zachodzą różne procesy „wchodzenia” nanocząstek lipidowych do wnętrza komórki. Badania antybakteryjne przeprowadzone przez Doktoranta dla nanocząstek GMO/GML wobec bakterii *E. coli* oraz *S. aureus* nie wykazały znaczącej aktywności.

Lektura rozdziału „Wyniki i dyskusja” pokazuje bardzo dużą dojrzałość naukową Doktoranta, gdyż wszystkie uzyskane wyniki zostały gruntownie przedyskutowane w świetle opublikowanych wcześniej badań. Szczególnie podoba mi się kompleksowa analiza wyników badań biologicznych. Szkoda tylko, że nie udało się „zapakować” do lipidowej nanocząstki ciekłokrystalicznej GMO wybranego leku lub cząsteczki do obrazowania. Byłoby to doskonałym zwieńczeniem pracy doktorskiej, jednak zdaję sobie sprawę, że wymagałoby to znacznego wydłużenia prac eksperymentalnych. Ostatni rozdział pracy doktorskiej, zatytułowany „Podsumowanie” zawiera krótkie zestawienie wyników oraz bardzo cenny opis perspektyw rozwoju badań w zakresie sprawdzenia toksyczności LLCNPs GMO wobec komórek krwi. Dodatkowo Doktorant wskazał możliwość dalszych badań antybakteryjnych dla LLCNPs zbudowanych z GMP/GML z „zapakowanym” antybiotykiem. Rozdział ten wyraża recenzentowi potencjalne pytania o dalsze plany badawcze.

Do najważniejszych osiągnięć pracy, stanowiących jednocześnie element nowości naukowej, zaliczam **pełną charakterystykę fizykochemiczną i biologiczną wybranych LLCNPs** oraz pokazanie, że **LLCNPs zbudowane z GMO posiadają wysoki potencjał jako nośniki leków**. Na podkreślenie zasługuje fakt przeprowadzenia przez Doktoranta eksperymentów w szerokim zakresie interdyscyplinarności tj. od wytworzenia i optymalizacji składu lipidowych nanocząstek ciekłokrystalicznych, poprzez ich pełną charakterystykę fizykochemiczną do określenia ich bezpieczeństwa biologicznego i aktywności przeciwbakteryjnej. Reasumując, uważam, że cel pracy doktorskiej został w pełni osiągnięty. Wartość merytoryczną rozprawy mgr inż. Jakuba Jagielskiego potwierdza fakt, że jest to materiał już częściowo opublikowany, a więc przepuszczony przez gęste sito wnikliwych recenzji specjalistów w dziedzinie.

Na zakończenie recenzji warto podkreślić, że p. Jakub Jagielski jest współautorem dwóch publikacji naukowych w czasopiśmie z listy JCR. Jedną z tych publikacji to materiał umieszczony w pracy doktorskiej. Doktorant brał także aktywny udział w prezentowaniu wyników naukowych w

formie doniesień podczas pięciu konferencji a także uczestniczył w dwóch stażach zagranicznych oraz pracował jako wykonawca w realizacji dwóch projektów naukowych.

Uważam, że tematyka pracy doktorskiej jest bardzo interesująca i niezwykle potrzebna w świetle poszukiwań nietoksycznych i skutecznych nośników leków. Część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana a wyniki doskonale przedyskutowane i zinterpretowane. Rozprawa mgr inż. Jakuba Jagielskiego zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z wymaganiami artykułu 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.). W tym odniesieniu wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Fizyczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr inż. Jakuba Jagielskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki fizyczne.



Sylwia Rodziewicz-Motowidło