



Wrocław, 11.08.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Kiec pod tytułem  
"Mechanika kompleksów molekularnych oraz ich znaczenie biologiczne"  
zrealizowanej w Katedrze Inżynierii Biomedycznej pod kierunkiem Promotora  
prof. dr. hab. inż. Marka Langnera**

Wiele dotychczas zgromadzonych danych eksperymentalnych wskazuje, że właściwości mechaniczne agregatów używanych jako nośniki leków rzutuje na ich efektywność zarówno na poziomie komórkowym jak i ogólnoustrojowym. Podstawowe cech nośników liposomalnych w przeważającym stopniu determinowane są zdolnością lipidów do tworzenia struktur lamelarnych, a ich parametry fizykochemiczne mogą wpływać na ich selektywność i skuteczność terapeutyczną w perspektywie zmniejszonej toksyczności nieswoistej. W ostatnich latach mamy do czynienia z lawinowym przyrostem ilości doniesień naukowych na temat różnorodnych strategii celowania względem różnorodnych receptorów znajdujących się na powierzchni komórek docelowych. Z drugiej strony, tzw. mechanocelowanie jawi się jako bardzo atrakcyjne dopełnienie obecnie eksplorowanych obszarów zastosowania liposomowych nośników leków. By w pełni wykorzystać tego typu podejście konieczne jest tworzenie nowych narzędzi pozwalających na badania właściwości mechanicznych liposomowych nośników leków zarówno w kontekście przydatności terapeutycznej jak i procesów technologicznych wykorzystywanych do ich produkcji, co jest niezbędne do jednoznacznej interpretacji wspomnianych zależności i usprawnienia prac optymalizacyjnych.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska to owoc zmierzenia się Autorki z wspomnianą powyżej problematyką. Podjęła się ona niełatwego zadania polegającego na próbach uzyskania opisu ilościowego mechanicznych właściwości struktur liposomowych z wykorzystaniem niestandardowego podejścia eksperymentalnego. Część zadań zrealizowana została w oparciu o wcześniej wykorzystywane techniki i modele pęcherzyków błonowych o dużej średnicy (powyżej 1  $\mu\text{m}$ ), jednak najważniejszym elementem pracy jest zaproponowana nowatorska metodologia oraz model matematyczny pozwalające na badania liposomów o submikrometrowych średnicach cząstek charakterystycznych dla nośników terapeutycznych. W tej perspektywie należy podkreślić, że poruszana w pracy tematyka świetnie wpisuje się w trendy światowej nauki, a Autorka nie ograniczyła się jedynie do wygenerowania ciekawych danych i opartych o nie



odważnych hipotez, ale przede wszystkim wykazała, że jej nowe podejście eksperymentalne ma duży potencjał implementacyjny zarówno w naukach podstawowych jak i stosowanych. Szkoda, że temat rozprawy doktorskiej został sformułowany w niezbyt fortunny sposób. Z jednej strony jest mało precyzyjny, gdyż nie odnajdziemy w nim informacji, że jedynymi badanymi kompleksami molekularnymi były pęcherzyki lipidowe, a z drugiej strony daje czytelnikowi obietnicę omówienia biologicznego znaczenia poczynionych odkryć bez szans na jej spełnienie. Dane dotyczące wpływu właściwości mechanicznych badanych kompleksów molekularnych na przebieg procesów biologicznych nie zostały w dysertacji uwzględnione, co stoi w sprzeczności z deklaracjami Autorki w streszczeniu (ostatnie zdanie) i rozdziale podsumowującym badania (rozdział trzeci).

Mgr inż. Joanna Kiec przedstawiła swoje osiągnięcia naukowe w postaci zestawu czterech, powiązanych ze sobą tematycznie publikacji wieloautorskich. Pierwsza praca to zwięzła monografia w języku polskim przedstawiająca w sposób ogólny spektrum zastosowań liposomowych nośników substancji biologicznie czynnych. Zdecydowanie większą wartość mają trzy pozostałe artykuły eksperymentalne opublikowane w czasopismach o międzynarodowym zasięgu (sumaryczny współczynnik oddziaływania Impact Factor przekracza 9): *Journal of Membrane Biology*, *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* oraz *Materials*. We wszystkich artykułach składających się na rozprawę doktorantka jest pierwszą współautorką oraz pełni jednocześnie funkcję autora korespondującego. Informacje zawarte na stronie czwartej dysertacji wyraźnie wskazują na znaczącą rolę Doktorantki w powstaniu tych publikacji, polegającą na przygotowaniu koncepcji, przeprowadzeniu eksperymentów i częściowym ich planowaniu, opracowaniu danych, analizie i interpretacji wyników oraz wiodącej roli w przygotowaniu manuskryptów. Szkoda, że nie dołączono odpowiednich oświadczeń współautorów tych publikacji. Doktorantka jest jeszcze współautorką dwóch innych publikacji w międzynarodowych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania. Tym samym wkład doktorantki w rozwój dziedziny nauki jest wyraźnie zauważalny, co znajduje potwierdzenie także w sumarycznej ilości cytowań opublikowanych prac wynoszącej 43 (bez autocytowań, wg bazy Scopus na dzień sporządzenia recenzji). Ponadto, Doktorantka jest współautorką doniesień prezentowanych na konferencjach krajowych oraz międzynarodowych. Warto podkreślić, że z sukcesem aplikowała ona także o wsparcie swoich badań, co zaowocowało uzyskaniem dofinansowania w ramach konkursu „Diamentowy Grant” organizowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.





Na rozprawę doktorską, oprócz wspomnianych powyżej publikacji składają się dodatkowe elementy przygotowane w języku polskim, takie jak streszczenie (także w wersji anglojęzycznej), lista symboli i skrótów, cel i teza pracy, opis pracy oraz podsumowanie i perspektywy badań wraz z bibliografią. Te fragmenty pracy mają na celu przede wszystkim wprowadzenie czytelnika w zagadnienia poruszane w publikacjach eksperymentalnych stanowiących rdzeń dysertacji. Bardzo dobrym posunięciem jest zebranie szczegółowych celów projektu badawczego w postaci zwartej listy zawartej w pierwszym rozdziale. Z drugiej strony, Autorka zachowuje powściągliwość przy opisie zagadnienia wpływu kształtu i sztywności cząstek na ich aktywność biologiczną, co w perspektywie powoływania się przez nią na koncepcję mechanocelowania jest zaskakujące. Z pewnością nie ma potrzeby wyszczególniania wszystkich błędów edytorskich bądź typograficznych, które znaleźć można w omawianym fragmencie pracy (brak tłumaczenia podpisów na niektórych rycinach na język polski, niepotrzebne zubożenie podpisów pod niektórymi rycinami skutkujące brakiem informacji o poszczególnych panelach, dwuznaczności w opisie parametrów: „współczynnik sztywności zginania” kontra „współczynnik sztywności na zginanie”, niejednoznaczne przypisanie czterech parametrów do trzech składowych deformacji błon, itp.), jednak kilka przedstawionych poniżej kwestii wymaga sprostowania bądź uściślenia, szczególnie, że tekst z pewnością będzie źródłem informacji i inspiracji dla innych naukowców i studentów. Przede wszystkim trudno się zgodzić ze stwierdzeniem, że liposomy wykazują zgodność metaboliczną z komórkami (s. 10), a lipidy w rozpuszczalnikach organicznych spontanicznie grupują się w struktury liposomowe (s. 11). Głębszego komentarza wymagają też stwierdzenia, że „...dopiero przy 20 °C rozmiar liposomów przestaje być zależny od temperatury.” oraz „Po 6. cyklu stabilizuje się również siła ekstruzji, co wskazuje, że liposomy w próbce zostają uformowane...” ze s. 20, jak również pojęcie „antydefektów dwuwarstwy lipidowej” (s.23). Przekaz zyskałby także na klarowności po wprowadzeniu do tabeli 1 dodatkowego wiersza z przewidywanymi wielkościami/średnicami liposomów względem średnic porów membran stosowanych do ekstruzji (w odniesieniu do informacji na s. 85) oraz zachowaniu większej precyzji przy opisie wykonanych eksperymentów (m.in. brak wzmianki, że w badaniach opisywanych na s. 16 porównywano wyniki uzyskiwane z mikroskopu fluorescencyjnego z analogicznymi uzyskiwanymi dzięki mikroskopowi konfokalnemu; nie do końca prawdziwe stwierdzenie, że w pracy 2. stwierdzono brak różnic właściwości mechanicznych w zależności od rozmiaru liposomów – w tej pracy trudno znaleźć odpowiedni komentarz na ten temat, nie ma tam też informacji w zakresie jakich wielkości/średnic liposomów



prowadzono badania, itp.). Bardzo wskazane byłoby także zdefiniowanie pojęcia kierowanych nośników substancji biologicznie czynnych, gdyż w odczuciu recenzenta to, co sugeruje Autorka w pierwszym zdaniu podsumowania na s.51-52 nie uwzględnia aspektu selektywności i predefiniowanej lokalnej akumulacji w organizmie po podaniu nośników.

Badania, które przeprowadziła mgr inż. Joanna Kiec w ramach realizacji projektu doktorskiego mają nie tylko dużą wartość poznawczą, ale są także bardzo dobrym przykładem kreatywnego podejścia metodologicznego w procesie eksplorowania właściwie zidentyfikowanych przez nią obszarów badawczych. Wspólnym mianownikiem trzech prac eksperymentalnych jest dążenie do obiektywizacji metodologii pomiarów właściwości mechanicznych liposomów wraz z identyfikacją czynników mających potencjalny wpływ na uzyskiwane wyniki. Docenić należy przede wszystkim próby wyjścia poza ramy zdefiniowane przez dotychczas wykorzystywane w tego typu pomiarach techniki eksperymentalne. Druga praca przedstawionego do recenzji cyklu stanowi cenny wkład w rozwój techniki spektroskopii drgań termicznych mającej zastosowanie w wyznaczaniu współczynnika sztywności zginania (ang. bending rigidity) błon liposomów o średnicy przekraczającej 1  $\mu\text{m}$ . Przeprowadzone badania wskazały, że zarówno rodzaj stosowanej sondy fluorescencyjnej jak i tryb obrazowania (mikroskopia fluorescencyjna szerokiego pola vs mikroskopia konfokalna) nie wpływają znacząco na uzyskiwane wyniki. Natomiast rozbudowana analiza statystyczna prezentowanych w pracy wyników wskazała na asymetryczny rozkład otrzymanych danych liczbowych i tym samym pozwoliła zidentyfikować potencjalne źródło rozbieżności uzyskiwanych dotychczas wartości badanego parametru.

W odczuciu recenzenta centralnym punktem rozprawy są dwie kolejne publikacje recenzowanego cyklu, a ich wspólnym rdzeniem jest innowacyjne podejście metodologiczne. Z opublikowanych dotychczas raportów wyłania się obraz bardzo ograniczonych, lub wręcz niemożliwych do realizacji pomiarów właściwości mechanicznych pęcherzyków lipidowych w skali submikrometrowej. Zaproponowane w tych publikacjach rozwiązanie opiera się na pomiarach siły i przepływu w trakcie procesu ekstruzji, co w połączeniu z prostotą koncepcyjną i automatyzacją procesu otwiera możliwości zaimplementowania tego rozwiązania zarówno w skali laboratoryjnej jak i technologicznej. Autorzy przeprowadzili systematyczną analizę właściwości fizykochemicznych uzyskiwanych liposomów w zawiesinie wodnej z użyciem szeroko stosowanych metod dynamicznego rozpraszania światła i kriogenicznej transmisyjnej mikroskopii





elektronowej. Interpretacja uzyskanych wyników w kontekście danych literaturowych pozwoliła autorom wysnuć bardzo interesujące, a jednocześnie odważne twierdzenie, że mechaniczne właściwości dwuwarstwy lipidowej zasadniczo nie zależą od średnicy pęcherzyków liposomowych (dla liposomów o średnicy co najmniej 100 nm). Osiągnięcie to zmotywowało Autorów do wykorzystania wygenerowanych za pomocą ich systemu eksperymentalnego danych do opisu mechanizmu formowania pęcherzyków jednowarstwowych w procesie ekstruzji na poziomie molekularnym. Dodatkowo, w trakcie tych eksperymentów monitorowano wymianę lipidów pomiędzy indywidualnymi pęcherzykami metodą transferu energii rezonansu Förstera (FRET). Dane z tego etapu badań posłużyły do stworzenia nowej, alternatywnej w stosunku do dotychczasowych koncepcji opisującej poszczególne etapy jednego z najczęściej wykorzystywanych w skali laboratoryjnej i technologicznej procesów formowania liposomów, co świadczy o bardzo twórczej i śmiałej postawie Autorów. Doktorantka podsumowuje to stwierdzeniem, że podczas ekstruzji liposomów nie zachodzi zjawisko fuzji liposomów oraz nie zostaje utworzony cylindryczny pęcherzyk wewnątrz porów membrany poliwęglanowej, a proponowany przez nią model przewiduje powstawanie liposomów na wejściu do pora w wyniku dezintegracji większego pęcherzyka na mniejsze, jednowarstwowe liposomy.

Przy rozważaniu wartości naukowej omawianych prac należy zaznaczyć, że dobór metod i sposób realizacji badań nie budzi większych zastrzeżeń. Generalnie, konkluzje, choć w kilku aspektach odważne i w dużym stopniu warunkowane założeniami, znajdują swoje odzwierciedlenie w przedstawionych danych, a wyniki mają nie tylko wartość poznawczą, ale także potencjał aplikacyjny. Niemniej, pojawia się kilka opisanych poniżej kwestii, które wymagałyby bardziej dogłębnej dyskusji.

1. Przede wszystkim, jak zostało to trafnie ujęte w ostatniej pracy cyklu, przebieg procesu ekstruzji zależy nie tylko od współczynnika sztywności zginania ale także od innych właściwości dwuwarstwy lipidowej (m.in. jej przepuszczalności dla cząsteczek wody), co zresztą najprawdopodobniej znalazło odzwierciedlenie w obserwowanych niezgodnościach pomiędzy parametrami mierzonymi przez Autorów, a danymi literaturowymi dla dwuwarstw zawierających różne stężenia cholesterolu. W związku z tym rodzi się pytanie czy istnieje uniwersalna ścieżka interpretacji danych uzyskanych w zaproponowany sposób dla układów, względem których brakuje odniesienia do innych danych literaturowych?

2. W jaki sposób wyjściowe parametry (warstwowość, wielkość, homogenność itp.) pęcherzyków MLV (które z pewnością są zależne od składu lipidowego, ale także od warunków przygotowania itp.) mogą wpływać na mierzone parametry mechaniczne?



3. Na ile zaprojektowany i wykorzystywany w pracy system pomiarowy może być wrażliwy na fluktuacje wynikające z jego mechaniki (np. opór wynikający z tarcia tłoczków względem powierzchni wewnętrznych strzykawkę i jego zmiany w trakcie eksperymentu i przy kolejnych powtórzeniach)? W tym kontekście, nietrudno sobie wyobrazić, że zawiesina liposomów w porównaniu do czystych roztworów wodnych może stanowić rodzaj lubrykanta dla mechanicznych elementów systemu.
4. Czy bardzo słaby odzysk lipidów po ekstruzji w niektórych eksperymentach nie rzutował negatywnie na możliwości obiektywnego przeprowadzenia pomiarów rozmiaru i PDI liposomów?
5. Jakie mogłyby być racjonalne wytłumaczenie formowania się stosunkowo dużych pęcherzyków liposomowych (o średnicach 200 – 500 nm) zbudowanych z DPPC w temp. 35 °C (faza pofałdowana, ang. ripple phase) przy niskich przepływach?
6. W ostatniej pracy zawartej w dysertacji autorzy sugerują, że siła ekstruzji w szóstym cyklu odzwierciedla głównie różnicę ciśnień konieczną do deformacji pęcherzyków podczas przepychania ich przez pory membrany. Jakie procesy mogą stać za niewielkim, aczkolwiek systematycznym obniżaniem się siły ekstruzji w kolejnych cyklach (s. 87, „Figure 4”)? Potrzeba dodatkowego komentarza pojawia się także przy porównaniu wartości na osiach rzędnych w „Figure 3” (s. 86) oraz „Figure 4A” (s. 87).

Rozważenie wyszczególnionych powyżej kwestii byłoby cennym dopełnieniem całości i amplifikując wrażenie, że cykl publikacji stanowiący podstawę recenzowanej pracy doktorskiej stanowi istotny i oryginalny wkład w rozwój reprezentowanej przez Autorkę dziedziny nauki.

Podsumowując, jestem przekonany, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Joanny Kiec spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r., poz. 1669 z późn. zm.), a dorobek naukowy Doktorantki w pełni uzasadnia nadanie jej stopnia naukowego doktora w dyscyplinie naukowej inżynieria biomedyczna. Niniejszym wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Joanny Kiec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Aleksander Czogalla, prof. UWr

Kierownik Zakładu Cytobiochemii,  
Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski,  
ul. F. Joliot-Curie 14a, 50-383 Wrocław, Polska  
tel. +48 71 375 63 56, e-mail: aleksander.czogalla@uwr.edu.pl