



Dr hab. Hanna Pruchnik, prof. uczelni

Wrocław, 21.08.2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Kiec
pt. „Mechanika kompleksów molekularnych oraz ich znaczenie biologiczne”**

Praca doktorska mgr inż. Joanny Kiec została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Marka Langnera w Katedrze Inżynierii Biomedycznej na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej. Badania były finansowane i prowadzone w ramach projektu, pt.: „Określenie wpływu rozmiaru agregatów lipidowych na ich właściwości mechaniczne oraz elektrostatyczne”, Diamentowy Grant (0120/DIA/2018/47). Głównym celem pracy była weryfikacja dwóch tez: 1) krzywizna dwuwarstwy lipidowej związana z rozmiarem pęcherzyków wpływa na właściwości mechaniczne liposomów, 2) siła ekstruzji liposomów jest związana z właściwościami mechanicznymi badanych układów.

Przedłożona do recenzji rozprawa została przedstawiona w formie zbioru czterech powiązanych tematycznie artykułów wraz z 20-stronicowym opisem. Dysertacja jest spójna i tworzy dobrze udokumentowaną, logiczną całość, napisaną w sposób zwięzły i przejrzysty. Pierwsza część rozprawy, omawiająca cykl publikacyjny, rozpoczyna się od spisu artykułów, które wchodzi w jej skład, zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim, listę symboli oraz skrótów. Następnie, jako odrębne rozdziały przedstawiono cel badań i tezy rozprawy oraz opis pracy, będący przewodnikiem/komentarzem do załączonych artykułów. W tekście zamieszczono również oryginalne rysunki i schematy z omawianych publikacji. Zakończeniem całości opisu jest dwustronicowe podsumowanie i omówienie perspektyw badań. Dołączony spis cytowanej, aktualnej w omawianym temacie literatury, składa się z 116 pozycji.



Podstawą rozprawy są trzy oryginalne prace opublikowane w czasopismach z listy JCR (*The Journal of Membrane Biology*, *BBA-Biomembranes*, *Materials*) oraz artykuł przeglądowy - rozdział w monografii wydanej przez Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu. Wyniki badań opublikowano w renomowanych czasopismach, a zatem praca naukowa została już zweryfikowana i pozytywnie oceniona przez niezależnych specjalistów z odpowiedniej dyscypliny. Zgodnie z zamieszczonym oświadczeniem Doktorantki jej wkład w powstanie publikacji jest znaczący (oświadczenia współautorów nie zostały dołączone). Pani mgr Joanna Kiec brała udział w opracowaniu koncepcji wszystkich artykułów, zaplanowała i przeprowadziła eksperymenty, zinterpretowała, opracowała i przeanalizowała uzyskane dane. Mgr Joanna Kiec przygotowała wszystkie manuskrypty do publikacji i jest ich pierwszym autorem, była także odpowiedzialna za kontakt z wydawnictwem. Wszystko to świadczy o tym, iż Doktorantka posiada szeroką wiedzę w zakresie realizowanego tematu badawczego oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Praca Pani mgr Joanny Kiec wpisuje się w bardzo popularny trend tworzenia nanoagregatów lipidowych w formie liposomów jako skutecznych „narzędzi farmakologicznych”. Badania podjęte przez Doktorantkę są istotne, ponieważ określenie właściwości mechanicznych dwuwarstwy lipidowej ma duże znaczenie ze względu na szerokie spektrum zastosowania pęcherzyków lipidowych. Właściwości mechaniczne liposomów muszą być uwzględnione i odpowiednio dobrane przy projektowaniu ukierunkowanych systemów dostarczania substancji bioaktywnych w liposomach (przemysł farmaceutyczny, kosmetyczny, spożywczy). Liposomy są powszechnie stosowane w badaniach molekularnego mechanizmu fuzji błon, w badaniach transportu przez błony, w badaniach oddziaływań białek, leków i innych substancji z lipidami. Właściwości mechaniczne mają wpływ na stabilność i czas cyrkulacji liposomów w układzie, wpływają na efektywność ich wychwytu przez komórki docelowe oraz efektywność akumulacji w odpowiednich tkankach. W związku z powyższym wybór tematu badawczego jest jak najbardziej zasadny. Należy podkreślić, że właściwości mechaniczne dwuwarstwy lipidowej były wcześniej badane prawie wyłącznie przy użyciu mikropęcherzyków, natomiast Doktorantka przedstawiła koncepcję nowej techniki pomiarowej do wyznaczenia właściwości mechanicznej



liposomów o średnicy poniżej 1 mikrometra. Nie ma więc wątpliwości, że praca ma charakter oryginalny i aplikacyjny.

Cykl publikacji rozpoczyna artykuł przeglądowy, pt. *„Kierowane nośniki substancji biologicznie czynnych jako element podniesienia jakości życia społeczeństwa”* będący wprowadzeniem do technologii liposomowej. Autorka podaje przykłady licznego wykorzystania liposomów w produkcji suplementów diety, kosmetologii, farmacji i opisuje korzyści wynikające z ich stosowania. Celem badań przedstawionych w drugiej pracy *„Statistical Analysis of Bending Rigidity Coefficient Determined Using Fluorescence-Based Flicker-Noise Spectroscopy”* było wyznaczenie współczynnika opisującego własności mechaniczne dwuwarstwy dla statystycznie istotnej liczby liposomów oraz próba weryfikacji tezy, że krzywizna dwuwarstwy lipidowej związana ze średnicą liposomów ma wpływ na ich właściwości. Obiektem badań były ogromne liposomy (GUV) o średnicy powyżej 1 μm uformowane z POPC lub DOPC. Właściwości mechaniczne błony oceniono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego, stosując technikę bazującą na analizie obrazu fluktuacji termicznych dwuwarstwy lipidowej. Na podstawie analizy uzyskanych obrazów i odpowiednio dobranego modelu wyznaczono współczynnik sztywności membrany na zginanie. Zastosowanie dużej liczby liposomów i uzyskanie wielu danych eksperymentalnych pozwoliło na przeprowadzenie analizy statystycznej mającej na celu identyfikację rozkładu, który jest najbardziej odpowiedni do obliczenia wartości współczynnika sztywności zginania.

Zadaniem badawczym, realizowanym w pracy trzeciej i czwartej była weryfikacja tezy czy siła ekstruzji liposomów jest związana z właściwościami mechanicznymi dwuwarstwy lipidowej oraz sprawdzenie czy wartości parametrów mechanicznych zmierzone dla modelu GUV można odnieść do liposomów o rozmiarach submikronowych. W tym celu opracowano nową metodę wyznaczania właściwości mechanicznych liposomów, możliwą również do wdrożenia w skali technologicznej. Zaletą tej metody jest to, iż badaniu podlega cała populacja formowanych liposomów, a do układu nie wprowadza się żadnych dodatkowych substancji. W publikacji nr 3 *„The effect of lipid phase on liposome stability upon exposure to the mechanical stress”* przedstawiono wyniki badań dla dużych jednowarstwowych liposomów (LUV) utworzonych z wykorzystaniem automatycznego ekstrudera wyposażonego w termostat i tensometry. Zbadano



wpływ parametrów procesu wytłaczania, takich jak temperatura, średnica porów membrany, siła wytłaczania i strumień objętościowy na właściwości liposomów uformowanych z DPPC. Przy wykorzystaniu techniki dynamicznego rozpraszania światła (DLS) wyznaczono średni rozmiar pęcherzyków oraz wskaźnik polidispersyjności. Dodatkowo, rozmiar i topologię liposomów analizowano za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (cryo-TEM). Pokazano, że stabilność liposomów jest ściśle zależna od fazy lipidowej, a właściwości mechaniczne dwuwarstwy są znacząco zależne od temperatury jedynie w fazie żelowej lipidu. Stwierdzono, że wyznaczone właściwości mechaniczne dwuwarstwy lipidowej i ich zależność od temperatury są zgodne z wynikami literaturowymi dla GUV, co uprawnia do stwierdzenia, że właściwości mechaniczne dwuwarstwy lipidowej nie zależą od wielkości liposomu w zakresie od 100 nm do setek mikrometrów.

W czwartej pracy, pt. „*The Elucidation of the Molecular Mechanism of the Extrusion Process*”, przedstawiono kontynuację badań z wykorzystaniem nowej techniki pomiarowej dla liposomów LUV uformowanych z POPC lub mieszaniny POPC i cholesterolu. Podobnie jak poprzednio, rozmiar pęcherzyków lipidowych wyznaczano techniką DLS oraz obrazowania cryo-TEM. Dodatkowo, do sprawdzenia czy podczas ekstruzji lipidy są wymieniane między pęcherzykami wykorzystano znaczniki fluorescencyjne i metodę opartą o zjawisko FRET. Wykazano, że podczas przeciskania przez filtr nie zachodzi zjawisko fuzji liposomów i nie zachodzi wymiana lipidu. Ponadto, porównano siłę ekstruzji z literaturowymi wartościami współczynnika sztywności na zginanie dwuwarstwy - uzyskane wyniki są zgodne z wynikami dla liposomów typu GUV, czyli potwierdzają wystąpienie podobnych efektów w nano- i mikroskali.

Po analizie wszystkich publikacji stwierdzam, że cel pracy został zrealizowany, a przyjęte założenia badawcze zweryfikowano i wyjaśniono.

Czytając pracę nasunęło mi się kilka pytań, uprzejmie proszę Doktorantkę o odpowiedź na intrygujące mnie kwestie:

- ✓ W dysertacji, w opisie wyników z pracy nr 2, Doktorantka stwierdza, że nie zauważono istotnej korelacji pomiędzy współczynnikiem mechanicznym a rozmiarem liposomów, co przemawia za tym, aby odrzucić hipotezę mówiącą o wpływie krzywizny dwuwarstwy na



właściwości badanych liposomów – proszę o uzasadnienie tego wniosku, nie jest to oczywiste na podstawie zaprezentowanych wyników.

- ✓ We wprowadzeniu (str. 14) podano Hamiltonian, w którym jedna ze stałych to „skuteczne napięcie powierzchniowe”, co oznacza skuteczne? Jaka jest wartość tego napięcia?
- ✓ W publikacji w czasopiśmie *Materials* (rysunek nr 3) przedstawiono przykładowy, oryginalny wynik pomiaru zależności siły ekstruzji od czasu dla liposomów uformowanych z POPC. Siła gwałtownie wzrasta, po czym następuje okres, w którym stabilizuje się na czas trwania procesu i jak możemy odczytać z wykresu - wartości siły ekstruzji wynoszą około 35-40 N (cykle 1-7). Na rysunku nr 4 przedstawiono zależność siły ekstruzji od liczby cykli dla liposomów uformowanych z tego samego lipidu, gdzie podane wartości sił ekstruzji są znacząco mniejsze, np. dla cyklu piątego wartość siły to około 5 N. Jak wyliczono wartość siły ekstruzji?
- ✓ Z jaką dokładnością została zmierzona siła ekstruzji? Na wykresach dla wartości siły mamy zaznaczone słupki błędów, jak policzono niepewności?
- ✓ Z czego wynikają duże różnice wartości siły ekstruzji dla liposomów w fazie ciekłokrystalicznej, złożonych z DPPC w porównaniu z liposomami POPC?

Drobne uwagi, nie wymagające komentarza/odpowiedzi Doktorantki.

- ✓ Nieprecyzyjne sformułowania, np. „temperatura przejścia przez filtr lipidu DPPC wykorzystywanego w doświadczeniu to 41°C, przed-przejściem – 33,5°C” (str. 22), powinno być „temperatura głównego przejścia fazowego lipidu DPPC, wykorzystywanego w doświadczeniu, to 41°C, a przed-przejścia - 33,5°C”.
- ✓ Używanie określeń „ilość cykli”, „ilość powtórzeń” zamiast „liczba powtórzeń”, „liczba cykli”.

Podsumowując, w mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Joanny Kiec jest opracowaniem naukowym stanowiącym oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Wyniki badań wnoszą znaczący wkład dla rozwoju i zastosowania procesu tworzenia liposomów, zarówno w naukach podstawowych, do tworzenia modeli eksperymentalnych, jak i aplikacyjnych – nanonośniki.



Doktorantka zna dobrze nowoczesny warsztat badawczy. Badania zawarte w dysertacji zostały właściwie zaplanowane, wykonane i opublikowane w renomowanych czasopismach. Oprócz artykułów stanowiących podstawę rozprawy Pani mgr inż. Joanna Kiec jest współautorką dwóch publikacji, jednego rozdziału w monografii, dwóch referatów, jednego komunikatu konferencyjnego i jednego streszczenia na konferencję (na podstawie bazy DONA PWr). Na podkreślenie zasługuje fakt, iż badania prowadzono w ramach grantu którego Doktorantka była kierownikiem. Wszystko to świadczy o samodzielności i zaangażowaniu w pracę naukową, jak również o cennych umiejętnościach pozyskiwania funduszy na badania.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Kiec spełnia kryteria Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce, stawiane pracom doktorskim. Zwracam się uprzejmie do Rady Dyscypliny Naukowej Inżynieria Biomedyczna o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.