



Gdańsk 30.08.2023

Dr hab. inż. Adam Macierzanka, prof. PG
Kierownik Katedry
Katedra Technologii Koloidów i Lipidów
Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

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

Recenzja pracy doktorskiej została przygotowana na podstawie dostarczonej mi dokumentacji. Złożona do oceny rozprawa doktorska składa się z czterech publikacji naukowych oraz skrótowego opisu wykonanej pracy i celu naukowego badań. Publikacje te stanowią spójny tematycznie cykl, opisujący zagadnienia teoretyczne oraz (przede wszystkim) wyniki oryginalnych badań naukowych. Publikacje te, to następujące pozycje:

1. **Doskocz, J.**, Drabik, D., Chodaczek, G., Przybyło, M., & Langner, M. (2018). Kierowane nośniki substancji biologicznie czynnych jako element podniesienia jakości życia społeczeństwa. In: Hanuza, J. (Ed.), *Jakość życia - środowiskowe aspekty życia*, Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu; pp. 85–102. <https://ksiegarnia.ue.wroc.pl/jakosc-zycia-srodowiskowe-aspekty-zycia>
2. **Doskocz, J.**, Drabik, D., Chodaczek, G., Przybyło, M., & Langner, M. (2018). Statistical Analysis of Bending Rigidity Coefficient Determined Using Fluorescence-Based Flicker-Noise Spectroscopy. *The Journal of Membrane Biology*, 251(4), 601–608. <https://doi.org/10.1007/s00232-018-0037-8>
3. **Doskocz, J.**, Dałek, P., Foryś, A., Trzebicka, B., Przybyło, M., Mesarec, L., ... Langner, M. (2020). The effect of lipid phase on liposome stability upon exposure to the mechanical stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(9), 183361. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183361>
4. **Doskocz, J.**, Dałek, P., Przybyło, M., Trzebicka, B., Foryś, A., Kobyliukh, A., ... Langner, M. (2021). The Elucidation of the Molecular Mechanism of the Extrusion Process. *Materials*, 14(15), 4278. <https://doi.org/10.3390/ma14154278>

Pierwsza z opublikowanych prac jest tekstem o charakterze przeglądowym; rozdziałem w polskojęzycznej monografii. Stanowi on obszerne opracowanie dotyczące wykorzystania liposomów jako kierowanych nośników substancji biologicznie czynnych w produktach przemysłu farmaceutycznego, spożywczego i kosmetycznego. Publikacja ta stanowi dobre wprowadzenie do oryginalnych badań Doktorantki, przedstawionych w pozostałych, trzech artykułach naukowych.

Artykuły te zostały opublikowane w anglojęzycznych czasopismach naukowych. Ich sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor) wynosi ok. 9,2 (wg JCR i zgodnie z rokiem publikacji). We wszystkich tych publikacjach Doktorantka jest zarówno pierwszym, jak i korespondencyjnym autorem, co świadczy o jej dużym zaangażowaniu w przeprowadzenie badań oraz w opracowanie wyników i obsługiwaniu samego procesu publikowania.

Ogólny zakres pracy doktorskiej obejmował badania właściwości mechanicznych liposomów. Zakres ten był sukcesywnie realizowany i opisany w publikacjach badawczych, które dotyczyły:

- Porównania metod pomiaru właściwości mechanicznych cząstek lipidowych (publikacja 2), oraz
- Zaproponowania i rozwoju nowych koncepcji na potrzeby oceny właściwości mechanicznych liposomów w skali odzwierciedlającej faktyczne rozmiary tych cząstek lipidowych w zastosowaniach przemysłowych, czyli w skali submikronowej (publikacja 3 i 4).

Praca doktorska miała na celu weryfikację dwóch tez:

- „Krzywizna dwuwarstwy lipidowej związana z rozmiarem liposomów wpływa na właściwości mechaniczne liposomów” oraz
- „Siła ekstruzji liposomów jest związana z właściwościami mechanicznymi badanych cząstek”.

Powyższe tezy zostały zweryfikowane we wnioskach, a ich weryfikacja znalazła odzwierciedlenie w przeprowadzonych badaniach, których efektem są publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej. Wszystkie, opisane powyżej, cztery publikacje zostały opublikowane w materiałach recenzowanych. Musiały zatem przejść przez skrupulatny, merytoryczny proces recenzji – zarówno jakości opisanych wyników naukowych (w tym ich nowatorstwa), jak i ich potencjalnego znaczenia w nauce i/lub przemyśle – której pozytywny wynik wymagany jest do akceptacji manuskryptu do publikacji.

Tematyka podjętych badań opiera się na słusznym założeniu, że właściwości mechaniczne liposomów mają bezpośredni wpływ na ich strukturę (w tym wielkość), stabilność oraz czas przenoszenia substancji aktywnej. Zasadniczym parametrem może być sztywność dwuwarstwy lipidowej liposomów, której charakteryzacji została poświęcona znacząca część rozprawy doktorskiej.

Doktorantka słusznie zauważa fakt dotychczasowej charakteryzacji właściwości mechanicznych liposomów przy użyciu takich wielkości tych cząstek lipidowych (wielkości powyżej mikrometra), które mają niewielkie zastosowanie w wytwarzanych przemysłowo formułacjach liposomalnych. Nie było dotychczas jasne w literaturze naukowej, czy parametry uzyskane przy użyciu takiego modelu eksperymentalnego można przełożyć na skalę nanometryczną. Doktorantka podjęła, w związku z tym, próbę ilościowej oceny właściwości

mechanicznych liposomów o rozmiarach submikronowych, które są powszechnie wykorzystywane w zastosowaniach technologicznych.

W publikacji nr 2, Doktorantka opisała własne badania eksperymentalne, a także zebrała i porównała wyniki właściwości mechanicznych liposomów (GUVs, giant unilamellar vesicles), uzyskane przy wykorzystaniu różnych metod pomiarowych i różnych metod analizy danych. Zwróciła przy tym uwagę na rozbieżności w wynikach otrzymywanych różnymi metodami.

Publikacje nr 3 i 4 opisują cenne wyniki naukowe. Nowe podejście eksperymentalne przedstawione w artykule nr 3 pokazuje, że właściwości mechaniczne dwuwarstwy lipidowej nie zależą od rozmiaru liposomu w zakresach powyżej 100 nm. Ponadto, przedstawiona metoda eksperymentalna, w połączeniu z modelem koncepcyjnym tworzenia cząstek liposomalnych, umożliwiła sformułowanie nowego parametru ilościowego („effective viscosity”; lepkość efektywna), który nie mógł być mierzony wcześniejszymi technikami pomiarowymi.

Dodatkowo, Doktorantka podjęła próbę zweryfikowania czy siła ekstruzji odzwierciedla właściwości mechaniczne liposomów. Wstępne wyniki nie dawały jednoznacznej odpowiedzi na to pytanie. W zawiązku tym, Doktorantka użyła znanego podejścia badawczego, opisującego liniową zależność wpływu stężenia cholesterolu w dwuwarstwie lipidowej na jej właściwości mechaniczne. Celem było zbadanie czy taka zależność może zostać również zaobserwowana w przypadku siły ekstruzji. Praca zawierała badania standaryzacji i optymalizacji procesów ekstruzji, które pokazały, że największy stopień homogeniczności próbki została uzyskany po sześciu cyklach ekstruzji.

Ostatecznie, doktorantka wykazała liniową zależność siły ekstruzji od stężenia cholesterolu, co stanowi wysokie podobieństwo tej zależności do zależności wsp. mechanicznego od zawartości cholesterolu w dwuwarstwie lipidowej. W zawiązku z tym, Doktorantce udało się zasadniczo potwierdzić tezę mówiącą o tym, że siła ekstruzji jest związana z właściwościami mechanicznymi dwuwarstwy.

Wyniki prac eksperymentalnych Doktorantki pozwoliły jej również ostatecznie odrzucić tezę mówiącą o tym, że krzywizna dwuwarstwy lipidowej ma wpływ na właściwości mechaniczne liposomów.

Warto w tym miejscu podkreślić, że uzyskane wyniki są cenne ze względów (i) aplikacyjnych – dostarczając nowych informacji do potencjalnych modyfikacji i udoskonalania procesów produkcji liposomów i charakteryzowania ich właściwości fizycznych, oraz ze względów (ii) naukowych – dostarczając nowej wiedzy na temat tego jak właściwości mechaniczne liposomów mogą wpływać na ich interakcje ze strukturami biologicznymi.

Ogólna ocena pracy

1. Literatura naukowa, przedstawiona w rozprawie doktorskiej obejmuje najnowsze publikacje naukowe, została starannie dobrana i świadczy o zdolności Doktorantki do efektywnego korzystania z źródeł literaturowych w celu analizy własnych danych oraz porównywania ich z innymi badaniami.
2. Doktorantka potrafi precyzyjnie i trafnie identyfikować problemy badawcze oraz formułować hipotezy.
3. Metody badawcze zostały właściwie wyselekcjonowane z myślą o celach naukowych. Warto zauważyć umiejętność Doktorantki w radzeniu sobie z trudnościami metodologicznymi podczas prowadzenia eksperymentów. Świadczy to o dużej zdolności analitycznego myślenia i biegłego posługiwaniu się różnymi technikami eksperymentalnymi.
4. Struktura rozprawy doktorskiej jest ogólnie czytelna i przejrzysta. Rozprawa obejmuje 103 strony (w tym kopie czterech publikacji) i składa się z rozdziałów, których układ jest zasadniczo typowych dla tego rodzaju opracowań.

Uwagi do pracy

Po zapoznaniu się z całością przedstawionej mi dokumentacji, chciałbym poruszyć kilka zagadnień, które się z nią wiążą. Poniższe uwagi oraz pytania dotyczące kwestii nieporuszonych w rozprawie doktorskiej nie wpływają na moją pozytywną ocenę pracy Doktorantki.

1. Nie jestem przekonany czy tak ogólny tytuł rozprawy doktorskiej („Mechanika kompleksów molekularnych oraz ich znaczenie biologiczne”) jest dobrym rozwiązaniem z punktu widzenia przyszłej rozpoznawalności tej pracy w środowisku naukowym, na którą to rozpoznawalność rozprawa ta z pewnością zasługuje. Osobiście uważam, że doprecyzowanie w tytule tego jakich kompleksów molekularnych i/lub jakich aspektów znaczenia biologicznego praca ta dotyczy, mogłoby się przyczynić do ułatwienia możliwości wyszukiwania tej rozprawy w zasobach literaturowych w przyszłości, przez naukowców i technologów zainteresowanych wytwarzaniem, właściwościami oraz zastosowaniem liposomów.
2. W rozdziale pierwszym rozprawy doktorskiej – „Cel i teza pracy” (str. 8), zarówno cel, jak i tezy pracy opisane są jedynie w ostatnim akapicie tego rozdziału. Pozostała zawartość rozdziału, mimo że cenna ze względu na zaprezentowane informacje, powinna być przedstawiona w swego rodzaju rozdziale, będącym Wprowadzeniem w przygotowanej rozprawie. Takie Wprowadzenie mogłoby również zawierać większość podstawowych informacji zaprezentowanych w pkt. 2.1 Opisu pracy.

3. W podsumowaniu pracy (str. 28), Doktorantka wspomina o tym, że liposomy stosuje się m.in. jako nośniki substancji kontrastujących lub leków, słusznie zauważając, że mogą to być substancje „silnie hydrofobowe”. Substancje takie musiałyby być przenoszone we wnętrzu dwuwarstwy lipidowej liposomów, podobnie jak cholesterol, który był używany w niektórych eksperymentach. Większość badań właściwości mechanicznych liposomów przeprowadzonych przez Doktorantkę dotyczyła sytuacji gdy struktura dwuwarstwy nie była zaburzona obecnością substancji hydrofobowych. Pytanie, w związku z tym, brzmi – w jakim stopniu otrzymane wyniki właściwości mechanicznych liposomów mogą mieć zastosowanie do sytuacji kiedy liposomy transportują hydrofobowe substancje lecznicze? Czy Doktorantka mogłaby się pokusić o dyskusję i/lub podanie przykładów innych badań, dotyczących tego, że takie transportowane leki hydrofobowe wpływały (lub nie wpływały) na sztywność/elastyczność liposomów, a przez to na ich interakcje ze strukturami biologicznymi.
4. W jelicie cienkim, strukturalne komponenty dwuwarstwy lipidowej – fosfolipidy, są efektywnie trawione przez fosfolipazę trzustkową do postaci lizofosfolipidów (zwłaszcza w obecności fizjologicznych soli żółciowych). Jak, zdaniem Doktorantki, może to wpłynąć na właściwości mechaniczne liposomów i ich funkcjonalność w warunkach ludzkiego przewodu pokarmowego?

Podsumowanie

Badania zrealizowane w ramach zaprezentowanej rozprawy doktorskiej są bardzo dobrze zaprojektowane. Nie stwierdzam istotnych uchybień, które mogłyby negatywnie wpłynąć na ogólną ocenę pracy. Jest to prawdopodobnie związane również z przeprowadzoną wcześniej recenzją poszczególnych publikacji, wymaganą w procesie publikowania.

Cała dysertacja jest opisem konsekwentnie przeprowadzonego projektu badawczego, który metodycznie analizuje problem naukowy, dzieląc logicznie określone etapy badań. Sprawia to, że Doktorantka prezentuje się jako naukowiec, który w swojej pracy wykazuje się umiejętnością poprawnego planowania i realizowania cyklu badań naukowych, z wykorzystaniem dobrego warsztatu badawczego. Dzięki temu pani mgr inż. Kiec była w stanie przedstawić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego na podstawie wyników własnych badań.

Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska stanowi oryginalny i istotny wkład w wiedzę naukową dotyczącą właściwości mechanicznych dwuwarstwy lipidowej struktur liposomalnych.

W mojej ocenie, Doktorantka spełnia ustawowe (Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce) i zwyczajowe kryteria wymagane do uzyskania stopnia doktora. Wnoszę, w związku z tym, o dopuszczenie pani mgr inż. Joanny Kiec do dalszych etapów postępowania, zmierzającego do nadania stopnia naukowego doktora.

Wniosuję również o wyróżnienie pracy doktorskiej. Wniosek swój argumentuję przekonaniem o istotności zaprezentowanych wyników badań, zarówno dla poszerzenia podstawowej wiedzy naukowej, dotyczącej właściwości cząstek lipidowych mogących służyć jako nośniki substancji aktywnych, jaki i ze względów aplikacyjnych – dla udoskonalania obecnych sposobów produkcji oraz metod analizy cząstek tego typu.

Z poważaniem

Kierownik
Katedry Technologii Koloidów i Lipidów

dr hab. inż. Adam Macierzanka
tel. +48 68 347 29 27

dr hab. inż. Adam Macierzanka, prof. PG