

Zabrze, 3 września 2024 r.

Dr hab. inż. Agnieszka Kowalczyk, prof. CMPW PAN
Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych
Polskiej Akademii Nauk
M. Curie-Skłodowskiej 34
41-819 Zabrze

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Aliego Marufa
pt.: „Trehalose releasing nanogels for autophagy stimulation”

Podstawa przygotowania recenzji i informacje ogólne dot. pracy doktorskiej

Niniejsza recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo prof. dr hab. inż. Doroty Neugebauer, Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej, z dnia 3 lipca 2024 r., informujące o powołaniu mnie poprzez Radę Dyscypliny Nauki Chemiczne na recenzenta rozprawy doktorskiej pana mgr. Aliego Marufa.

Przedłożona do recenzji praca doktorska pana mgr. Aliego Marufa pt.: „Trehalose releasing nanogels for autophagy stimulation” przygotowana została na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej, pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Ilony Wandzik. Promotorem pomocniczym była dr inż. Małgorzata Milewska.

Rozprawa doktorska obejmuje badania nad otrzymywaniem, funkcjonalizacją oraz właściwościami fizykochemicznymi i biologicznymi nanożeli polimerowych do stymulowania autofagii - procesu „samoczyszczania” komórek z nieprzydatnych i szkodliwych komponentów.

Omówienie układu pracy i jej ocena formalna

Praca doktorska została przedstawiona w formie jednotematycznego cyklu pięciu publikacji (oznaczonych **P1-P5**), z czego cztery to publikacje z badań własnych, a jedna to artykuł przeglądowy. Rezultatem badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej jest również zgłoszenie patentowe w Urzędzie Patentowym RP. W przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej zamieszczono kolejno następujące rozdziały: streszczenia w języku polskim i angielskim, spis treści, wykaz użytych skrótów i listę publikacji stanowiącą podstawę jej przygotowania. Następnie, po przedstawionym celu pracy doktorskiej, można wyszczególnić trzy główne rozdziały: wprowadzenie literaturowe, omówienie wyników badań, odnoszą-

Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych jest instytutem Polskiej Akademii Nauk

ce się do monotematycznego cyklu publikacji stan oraz wnioski i podsumowanie. Na końcu znajduje się bibliografia (90 pozycji literaturowych) i dorobek naukowy Doktoranta. Integralną częścią pracy są oświadczenia doktoranta i promotora o udziale współautorów publikacji, a także kopie publikacji P1-P5.

W opisie celu pracy Autor uzasadnił potrzebę poszukiwania nowych rozwiązań syntetycznych do budowy nanośników polimerowych, umożliwiających dostarczanie do komórek trehalozy - disacharydu wspierającego proces autofagii. Główne cele pracy, jakimi było otrzymanie i wszechstronna charakterystyka wielofunkcyjnych układów nanożelowych, zdolnych do tworzenia wiązań kowalencyjnych z różnymi częściami (bio)aktywnymi, zostały jasno sformułowane i pozwoliły czytelnikowi zapoznać się z założeniami pracy, której istotą było ich potencjalne wykorzystanie w systemach kontrolowanego dostarczania leków. Główne części pracy doktorskiej zostały podzielone na rozdziały ze ściśle uporządkowaną treścią. Pierwszy z nich zawierał wstęp teoretyczny, logicznie zaplanowany i adekwatny do zagadnienia. Przedstawione w dalszej części wyniki badań uzyskane przez Doktoranta ujęte zostały przejrzyście, wraz z odniesieniami do odpowiednich publikacji. Zwieńczeniem rozprawy było precyzyjne określenie wniosków i wytypowanie grupy koloidalnie stabilnych, nietoksycznych nanożeli o znacznej zawartości trehalozy, które najefektywniej uwalniały ten związek w określonym pH, wpływając w ten sposób na modelowe procesy autofagii.

Praca została napisana w języku angielskim. Język rozprawy pod względem merytorycznym i stylistycznym jest niezwykle dojrzały. Należy nadmienić, że Autorowi prawie całkowicie udało się uniknąć literówek, co świadczy o naprawdę wielkiej staranności przy edycji pracy.

Omówienie istotności badań

Tematyka podjętych przez Autora badań jest bardzo interesująca, w tym zarówno pod względem syntetycznym, jak i istotna ze względu na potencjalne zastosowanie uzyskiwanych materiałów polimerowych do kontrolowanego dostarczania i uwalniania substancji bioaktywnych. Podstawowym celem pracy pana mgr. Aliego Marufa było takie zaprojektowanie struktur nanożeli na poziomie molekularnym, aby spełniały one co raz to większe wymagania stawiane polimerowym nośnikom leków.

Wyzwania stawiane przez nowoczesną nanomedycynę systemom dostarczania leków (DDS) to m.in. rozmiar nośnika, tworzenie biokompatybilnych systemów polimerowych, stabilność *in vivo*, równomierna dystrybucja leku i jego dokładne uwalnianie w miejscu docelowym. Ważnym aspektem jest również rodzaj interakcji między polimerem a substancją aktywną, co w konsekwencji wpływa na szybkość i skuteczność jej podawania. W większości przypadków polimerowych DDS, leki są „uwięzione” przez fizyczną enkapsulację wewnątrz nośnika. Jednak brak jednorodności dystrybucji leku w nośniku polimerowym i słaba kontrola ilości załadowanej substancji mogą wpływać na jego stabilność i skuteczność transferu leku. Imobilizacja chemiczna (koniugacja) substancji czynnych z polimerami za pomocą np. wiązań kowalencyjnych lub jonowych wydaje się być korzystniejsza niż enkapsulacja fizyczna. Tworzenie stabil-

nych wiązań między przenoszonymi farmaceutykami a polimerem zapobiega niepożądanej migracji substancji wewnątrz nośnika i zapewnia kontrolę nad ilością wprowadzanego leku.

Zaletą nanożeli, będących przedmiotem tej rozprawy, w porównaniu do innych systemów polimerowych, jest to, że oferują one idealne trójwymiarowe środowisko dla biomolekuł. Ich zdolność do pochłaniania dużych ilości wody, porowata struktura, stabilność osiągana dzięki usieciowaniu i możliwość modyfikacji sprawiają, że są idealnymi kandydatami dla DDS. Znaczny stopień załadowania nanożelu można osiągnąć w stosunkowo łagodnych warunkach, zachowując aktywność biologiczną labilnych leków i biomakrocząsteczek. Wszystkie te unikalne właściwości nanożeli wzbudziły rosnące zainteresowanie ich wykorzystaniem w wielu obszarach biologii i medycyny. Niektóre z uzyskanych układów pełnią kilka funkcji jednocześnie, np. umożliwiają precyzyjny transport leku do danego miejsca lub umożliwiają diagnostykę schorzenia. Możliwości otrzymywania takich spersonalizowanych materiałów są niezwykle inspirujące dla chemików zajmujących się polimerami do zastosowań medycznych. Wielu badaczy, współpracujących w dalszych etapach badań ze specjalistami z zakresu biologii i medycyny zauważa jednak, że już niewielkie zmiany właściwości fizykochemicznych opracowywanych nośników polimerowych, wywołane procesami agregacji w środowiskach wodnych zawierających różnego typu dodatki, mogą znacząco wpłynąć na uzyskiwane wyniki w procesach ładowania i uwalniania substancji aktywnej, a także mieć wpływ na przeżywalność komórek w obecności nośnika.

To właśnie w tym miejscu pojawia się istotność badań podjętych przez Doktoranta. Zaprojektowanie skutecznie działającego nanonośnika polimerowego do transportu i uwalniania w odpowiednich warunkach substancji o działaniu terapeutycznym, jak również dokładne scharakteryzowanie uzyskanych nanożeli, nie tylko w wodzie ale przede wszystkim w mediach stosowanych w testach biologicznych, stanowiło z całą pewnością duże wyzwanie. Znalezienie odpowiednich korelacji pomiędzy wielokierunkową funkcjonalizacją uzyskiwanych nanostruktur, a ich właściwościami w roztworze i aktywnością biologiczną pokazały w rezultacie, jak wiele czynników może mieć wpływ na uzyskanie nietoksycznego nośnika o wydajnym działaniu. Takie podejście jest niezwykle cenne, a otrzymane wyniki, w dużej mierze interdyscyplinarnych badań, opublikowane w cyklu prac wnoszą istotny wkład z punktu widzenia zarówno nauk podstawowych jak i przyszłych aplikacji.

Omówienie i ocena zawartości merytorycznej

We wprowadzeniu literaturowym Autor zawarł zarówno najważniejsze informacje dotyczące wykorzystania różnego typu nanocząstek do dostarczania leków, z szczególnym uwzględnieniem nanożeli, jak i skupił się na głównym problemie badawczym jakim jest efektywne dostarczenie do komórek za pomocą wybranych nośników trehalozy, która okazuje się być niezwykle obiecującym związkiem wspierającym proces autofagii. Szczegółowy opis danych literaturowych dotyczących nośników tego związku, jak i możliwości jego wykorzystania do leczenia różnego typu schorzeń, w tym chorób neurodegeneracyjnych, autor przedstawił z kolei w publikacji przeglądowej **P1**. Na podstawie analizy tej części pracy można zde-

cydowanie stwierdzić, że badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej są w pełni uzasadnione i nowatorskie.

W następnej części Doktorant przedstawił wyniki badań własnych, zawarte w cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (**P2-P5**), wraz z ich dyskusją. Część ta obejmuje wyniki, można powiedzieć „wstępne”, dotyczące opracowania warunków syntezy nanożeli polimerowych metodą fotoinicjowanej wolnorodnikowej polimeryzacji prowadzonej w odwróconej emulsji. Nanożele posłużyły jako nośniki wybranego modelowego leku – doksorubicyny (DOX) (praca **P2**) i do otrzymywania tzw. polipleksów poprzez kompleksowanie kwasu nukleinowego miRNA (praca **P3**). Doktorant zademonstrował prostą i wydajną metodę przygotowania anionowych lub kationowych nanożeli N,N-dimetylakrylamidu zdolnych do elektrostatycznych oddziaływań odpowiednio z chlorowodorkiem DOX lub grupami grup fosforanowymi miRNA. Skupił się na optymalizacji warunków otrzymywania układów nanożelowych, badając jak wpływa skład komonomerów na właściwości uzyskanych struktur, takie jak rozmiar i skłonność do agregacji w roztworach wodnych. Opracowane wyniki syntetyczne stanowiły podstawę do przeprowadzenia dalszych badań w celu uzyskania nanożeli z chemicznie skoniugowaną trehalozą. Rezultaty tych badań zostały przedstawione w pracach **P4** i **P5**. Bardzo istotne i ciekawe dla potencjalnego zastosowania otrzymywanych materiałów było wykorzystanie do otrzymywania takich nanożeli (met)akrylanowych monomerów z wbudowaną w ich strukturę trehalozą, co umożliwiło jej późniejsze uwalnianie w odpowiednich warunkach środowiska. Doktorant bardzo szczegółowo zbadał jak różny skład komonomerów wpływa na właściwości fizykochemiczne nanożeli i szybkość uwalniania trehalozy. Wyznaczył rozmiary nanożeli, wartości potencjału zeta, zbadał ich zachowanie w roztworach wodnych i co ważne zbadał ich stabilność w mediach stosowanych w testach biologicznych. Tak zaplanowane podejście do badań pozwoliło Doktorantowi na znalezienie optymalnego składu nanożelu i wykorzystania go do badań biologicznych. Uzyskane rezultaty jasno pokazały, że docelowe systemy nanożelowe pozwalają na wydłużone uwalnianie trehalozy w pH=7,4. Co ważne, badania na liniach komórkowych i ocena aktywności uwalnianej z nanożeli trehalozy w procesie autofagii na wybranych organizmach stanowią w pracy doktorskiej doskonały dodatek pozwalający na potencjalne wykorzystanie takich nanożeli w medycynie.

Pan mgr Ali Maruf wykazał się bardzo dużą wiedzą, zarówno teoretyczną, jak i praktyczną co znalazło swoje odbicie w odpowiednim zaplanowaniu badań i ich systematycznej realizacji. Wszystkie rezultaty prac zostały zebrane w jasny dla czytelnika sposób, a wyprowadzone wnioski zostały poparte przez szczegółową charakterystykę. Na wielkie uznanie zasługuje imponująca liczba wykonanych syntez i szczegółowa charakterystyka uzyskanych nośników polimerowych. W swoich badaniach Doktorant wykorzystywał między innymi nowoczesne metody analityczne, w tym techniki rozpraszania światła, przeprowadzał testy cytotoksyczności i hemokompatybilności oraz przygotowywał próbki do badań mikroskopowych. Co ważne, uzyskane w pracy wyniki zostały ze sobą dokładnie skorelowane, pomimo jej wielowątkowości i co z tym związane bardzo dużej liczby przeprowadzonych eksperymentów. Chęć podkre-

ślić, że taka analiza stanowi bardzo duże osiągnięcie, które pozwoliło na wytypowanie najbardziej efektywnych systemów nanożelowych, które mogą być przekierowane do dalszych badań.

Rezultaty przeprowadzonych prac ukazały się w czterech bardzo dobrych artykułach. O nowatorstwie i innowacyjności badań świadczy również fakt ich dofinansowania ze środków Narodowego Centrum Nauki i Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej. Podsumowując, w mojej ocenie przedstawiona rozprawa doktorska stanowi bardzo wartościowe osiągnięcie naukowe, zawierające istotne elementy nowości naukowej.

W wyniku analizy pracy, niezależnie od mojego uznania dla wysokiej wartości merytorycznej, chciałabym poprosić Doktoranta o wyjaśnienie kilku fragmentów dyskusyjnych:

- We wprowadzeniu literaturowym, w rozdziale 2.1, na stronie 10 Autor podsumowuje: „*However, despite extensive research on the development of nanocarriers, their presence in the market remains limited.*” Uważam, że warto by było wyjaśnić dlaczego dostępność takich produktów jest ograniczona.
- W publikacji **P3**, w abstrakcie pojawia się stwierdzenie, zdaniem recenzenta wymagające doprecyzowania: „*Successful miRNA loading was confirmed by dynamic light scattering (DLS) and electrophoretic light scattering (ELS) measurements.*” Czy zdaniem Doktoranta zmiana średnicy hydrodynamicznej i potencjału zeta jest bezpośrednim dowodem skompleksowania kwasu nukleinowego z nanożelem?
- Str. 22, publikacja **P3** - dlaczego do badań wybrano stosunek grup aminowych polimeru do fosforanowych kwasu nukleinowego N/P zakresie od 2 do 10? Czy N/P=10 to stosunek przy którym nastąpiło całkowite związanie kwasu z polimerem? Skuteczną metodą oceny efektywności pełnego skompleksowania kwasu nukleinowego z polimerem kationowym jest elektroforeza na żelu agarozowym, która pozwala precyzyjnie określić wartość N/P, przy której zanika prążek migrującego (niezwiązanego z polipleksem) kwasu nukleinowego. Czy taka analiza została przeprowadzona? Obecność w próbce zarówno wolnego (nieskompleksowanego) kwasu nukleinowego, jak i nadmiaru polimeru kationowego może mieć znaczenie dla wyników transfekcji komórek z wykorzystaniem takiego wektora.
- Autor pracy wykazał, że zsyntetyzowane przez niego nanożele skutecznie uwalniają kowalencyjnie związaną trehalozę, w PBSie w 37 °C. Czy te warunki można odnieść do warunków przeprowadzenia eksperymentu *in vivo*, w którym indukowano z wykorzystaniem takich nanożeli proces autofagii?
- - Czy dla proponowanych systemów nanożelowych sensowne byłoby rozważenie wprowadzenia innych monomerów lub dodatków w celu poprawy ich stabilności?
- W niektórych miejscach język rozprawy mógłby być bardziej skoncentrowany na indywidualnym wkładzie kandydata. Zawiera kilka niepotrzebnych określeń, takich jak „*we hypothesize*” (strona 15) lub „*our group*” na stronach 24 i 25.

Chcę podkreślić tutaj, że moje uwagi i spostrzeżenia w najmniejszym stopniu nie podważają wartości merytorycznej pracy.

Wnioski końcowe

Podsumowując należy stwierdzić, że dobór prac stanowiący jednotematyczny cykl publikacji został dokonany spójnie i logicznie. Przedstawiona rozprawa doktorska pana mgr. Aliego Marufa obejmuje bardzo istotne zagadnienia badawcze z zakresu nowoczesnych materiałów polimerowych o dużym potencjale aplikacyjnym w biologii i medycynie. Uwagi zawarte w recenzji dotyczą spraw drugorzędnych lub mają wyłącznie charakter dyskusyjny i nie podważają wartości osiągniętych i ujętych w pracy wyników, dlatego pracę doktorską mgr. Aliego Marufa oceniam pozytywnie.

Chciałabym również podkreślić wyróżniający dorobek naukowy Doktoranta, który jest współautorem ponad dwudziestu publikacji, w tym pięciu publikacji związanych bezpośrednio z pracą doktorską, z których w czterech jest pierwszym autorem. Prace te ukazały się w bardzo dobrych czasopismach recenzowanych. Jest również współautorem zgłoszenia patentowego, głównym wykonawcą projektu finansowanego ze źródeł NCN i laureatem wielu stypendiów naukowych i nagród. Taki dorobek w pełni potwierdza dojrzałość naukową Doktoranta.

Stwierdzam, że przedstawiona praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną i praktyczną kandydata w dyscyplinie naukowej Nauki Chemiczne wraz z umiejętnościami samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Praca spełnia formalne wymagania stawiane przewodom doktorskim i warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* w odniesieniu do rozpraw doktorskich. W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej o dopuszczenie pana mgr. Aliego Marufa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, w kontekście osiągnięć badawczych udokumentowanych w rozprawie, a także z uwagi na wyróżniający się dorobek naukowy Doktoranta wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej o rozważenie wyróżnienia rozprawy. Wniosek o wyróżnienie uzasadniam przede wszystkim bardzo wysoką jakością merytoryczną przedstawionej pracy. Rozprawa zawiera elementy nowości naukowej i wnosi istotny wkład w rozwój dyscypliny nauki chemiczne w obszarze badań nad syntezą i potencjalnym zastosowaniem materiałów bazujących na nanożelach polimerowych w kontrolowanym dostarczaniu leków.

Podpisano odręcznie przez autora