

Kraków, 4 września 2024

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. inż. Ali Marufa
pt. *"Trehalose releasing nanogels for autophagy stimulation"*
zrealizowanej pod kierunkiem
Promotor prof. dr hab. inż. Ilony Wandzik
i Promotor pomocniczej dr inż. Małgorzaty Milewskiej

Recenzja została opracowana na podstawie uchwały
Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej
z dnia 3 lipca 2024 i zlecenia Przewodniczącej Rady Dyscypliny
Nauki Chemiczne Prof. dr hab. inż. Doroty Neugebauer.

W ostatnich latach prowadzi się coraz więcej badań nad nowymi systemami dostarczania leków i substancji biologicznie aktywnych, które mają na celu poprawę ich skuteczności farmakologicznej, przy zachowaniu odpowiedniego poziomu bezpieczeństwa dla pacjentów. W tym zakresie rozwijana jest nanomedycyna, a więc wykorzystanie nanotechnologii i nanomateriałów, które dzięki swoim rozmiarom nanometrycznym są w stanie oddziaływać z komórkami i tkankami na poziomie molekularnym. Takie nanoobiekty mogą przenikać w sposób kontrolowany przez błony biologiczne do zmienionych chorobowo komórek, dostarczając leki, które są np. nietrwałe w środowisku biologicznym.

Pan mgr inż. Ali Maruf w swojej pracy doktorskiej podjął się opracowania nowych systemów dostarczania trehalozy do komórek i tkanek w celu stymulowania autofagii. Doktorant założył w swojej



wimic

pracy, że poprzez odpowiedni dobór składu substratów i warunków syntezy będzie w stanie otrzymać nanożele polimerowe jako potencjalne nośniki leków, w tym trehalozy. Uważam więc, że wybór tematyki rozprawy doktorskiej jest trafny, aktualny i właściwie uzasadniony.

Praca doktorska pana Ali Marufa to cykl jednotematyczny pięciu publikacji, które zostały już opublikowane w recenzowanych, prestiżowych czasopismach anglojęzycznych o zasięgu międzynarodowym i wysokim współczynniku oddziaływania (*Journal of Medicinal Chemistry*, *Molecules* – 2 prace, *Biomaterials Advances*, *Journal of Nanobiotechnology*). Czasopisma, w których wydano artykuły, są umieszczone na liście *Journal Citation Report* a ich współczynnik oddziaływania IF wynosi od 4,6 do 10,2. Artykuły zostały opublikowane w latach 2022-2023; we wszystkich artykułach Doktorant jest pierwszym autorem. Ponadto Doktorant jest współautorem zgłoszenia patentowego. Tematem przewodnim analizowanych prac są badania nad opracowaniem systemów dostarczania trehalozy opartych na reagujących na bodźce nanocząstkach hydrożelowych. Jednakże oprócz realizacji celu głównego udało się autorowi wykazać przydatność opracowanych systemów jako nośników doxorubicyny i miRNA a także rozwiązać problemy praktyczne dotyczące znakowania fluorescencyjnego opracowanych nanocząstek, co pozwoliło na ich wizualizację i potwierdzenie aktywności biologicznej.

Tytuł dysertacji doktorskiej "*Trehalose releasing nanogels for autophagy stimulation*" został właściwie sformułowany i wskazuje, że praca dobrze wpisuje się w dyscyplinę nauki chemiczne.

Oprócz załączonych artykułów, streszczenia w języku polskimi i angielskim, listy skrótów użytych w pracy, dysertacja skrótowo przedstawia cele badawcze i zakres pracy (1 strona) i przegląd literatury (8 stron). Ponadto zawiera ona opis wyników (30 stron), podsumowanie i wnioski (2 strony) oraz spis piśmiennictwa (w sumie

90 pozycji z czego 5 pozycji stanowią prace doktoranta ujęte w cyklu publikacji). Dołączone zostały też oświadczenia doktoranta potwierdzające jego wkład w powstanie 5 powyższych artykułów naukowych, potwierdzone dodatkowo przez promotora. Praca spełnia więc podstawowe wymagania ustawowe i zwyczajowe dla prac doktorskich.

Następnie doktorant przedstawił listę swoich osiągnięć naukowych z ostatnich czterech lat, tj. gdy pracował nad swoim doktoratem, w tym listę prezentacji konferencyjnych (9 wystąpień), zgłoszenie patentowe, odbyte staże i przyznane nagrody, jak również aktywność w charakterze recenzenta artykułów. Podkreślić należy, że doktorant jest współautorem 16 innych prac naukowych, niezwiązanych z doktoratem, które były opublikowane w latach 2018-2022. Doktorant może pochwalić się więc imponującym dorobkiem jak na ten etap rozwoju naukowego.

W przeglądzie literatury doktorant pokrótce opisał zagadnienia dotyczące wykorzystania nanocząstek jako systemów dostarczania leków i układów wspierających diagnostykę różnych chorób. Opisał ich rodzaje, metody funkcjonalizacji oraz zamykania w nich leków i cząstek biologicznie aktywnych. Dalej skupił się na nanocząstkach hydrożelowych (nanożelach) opisując metody ich syntezy, oraz doniesienia literaturowe na temat wykorzystania do leczenia chorób centralnego układu nerwowego. Następnie opisał rolę i wykorzystanie trehalozy w technologii żywności i w zastosowaniach biomedycznych. Wykazał, że zgodnie z najnowszymi doniesieniami literaturowymi trehaloza jest w stanie indukować procesy autofagii, co może być zastosowane do leczenia różnych chorób, takich jak np. cukrzyca typu 2, choroba Parkinsona, choroba Alzheimera. Problemem jest jednak podatność trehalozy na degradację enzymatyczną, stąd uzasadniona wydaje się jej enkapsulacja, aby można było sterować jej uwalnianiem. Badania dotyczące enkapsulacji trehalozy są nowatorskie o czym świadczy stosunkowo mała liczba opublikowanych prac, które zaczęły pojawiać się w literaturze dopiero

w ostatnich kilku latach. Nie ma też zgody w literaturze jaki jest mechanizm stymulacji autofagii przez nanocząstki załadowane trehalozą. I tu nasuwa mi się pytanie do dyskusji w czasie publicznej obrony: *Jaki mechanizm stymulacji autofagii przez nanocząstki załadowane trehalozą – z kilku opisanych – jest według doktoranta dominujący w świetle jego studiów literaturowych i przeprowadzonych badań własnych?*

W rozdziale zatytułowanym Wyniki (Results) autor najpierw opisał rezultaty swoich badań nad syntezą nanożeli metodą fotoinicjowanej polimeryzacji wolnorodnikowej prowadzonej w odwróconej emulsji. Bardzo podoba mi się schemat, w którym w syntetyczny sposób na Rys 3B doktorant przedstawił kluczowe parametry syntezy nanożeli i drogę jaką przeszedł aby uzyskać próbki o najkorzystniejszych właściwościach. Wykazał się przy tym wiedzą i umiejętnościami jak kształtować strukturę tych nanożeli aby miały właściwości kationowe lub anionowe. W tym celu przeprowadził badania nad enkapsulacją modelowych leków: doksorubicyny w nanożelu anionowym i miRNA w nanożelu kationowym. W dalszej części skupił się już na nanożelach zawierających trehalozę, która byłaby kowalencyjnie związana z matrycą polimerową poprzez wiązanie estrowe i np. mogłaby być uwalniana pod wpływem zmiany pH. Doktorant uzyskał nanożele o średnicy od ok. 50 do poniżej 300 nm, stabilne koloidalnie, o kontrolowanym potencjale zeta (ujemnym lub dodatnim), zależnym od budowy łańcuchów polimerowych. Opracowane nanożele stymulowały autofagię warunkach *in vitro* i *in vivo*.

W rozdziale Podsumowanie i wnioski (Summary and conclusions) doktorant w sposób syntetyczny podsumował uzyskane wyniki i stwierdził, że cechuje je duży stopień nowatorskości, z czym jako recenzentka w zupełności się zgadzam.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że ta część pracy doktorskiej mgr. inż. Ali Marufa została bardzo dobrze zredagowana i nie mam do niej zastrzeżeń.

Teraz chciałabym odnieść się do załączonych artykułów doktoranta, które stanowią cykl publikacji.

W publikacji 1, przeglądowej, pt. *Trehalose-Bearing Carriers to Target Impaired Autophagy and Protein Aggregation Diseases*. *J. Med. Chem.* 2023, 66, 15613–15628. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.3c01442, ($IF_{2022} = 7.300$, $MEiN = 200$ pkt.) doktorant przedstawił stan wiedzy na temat nanonośników trehalozy, w których jest ona albo chemicznie skoniugowana albo zaenkapsulowana fizycznie i wykazał, że takie formułacje mogą w przyszłości poprawić skuteczność terapii chorób, których przyczyną są zaburzone mechanizmy autofagii. W końcowej części artykułu nakreślił dalsze kierunki badawcze w tym zakresie, które z jednej strony powinny udowodnić skuteczność i bezpieczeństwo nanonosników trehalozy, a z drugiej strony możliwość ich sterowanego dostarczania np. przekraczania bariery krew-mózg w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych a także selektywnego oddziaływania jedynie na komórki i tkanki zmienione chorobowo.

W publikacji 2, pt. *pH and Reduction Dual-Responsive Nanogels as Smart Nanocarriers to Resist Doxorubicin Aggregation Molecules*. 2022, 27, 5983. DOI: 10.3390/molecules27185983. ($IF_{2021} = 4.927$, $MEiN = 140$ pkt.) doktorant opisał rezultaty badań własnych nad opracowaniem degradowalnych anionowych nanożeli akrylowych reagujących na bodźce. Autor zaprojektował strukturę polimeru w taki sposób aby umożliwić jego oddziaływanie elektrostatyczne z dodatnio naładowaną doksorubicyną i wysoką efektywność enkapsulacji. Ponadto założył, że lek będzie uwalniany preferencyjnie przy obniżonym pH i podwyższonym stężeniu glutationu, a więc w środowisku typowym dla guza nowotworowego. Postawiona przez niego hipoteza została zweryfikowana eksperymentalnie i potwierdza jego kompetencje w zakresie syntezy polimerów i ich przetwarzania w nanocząstki.

W publikacji 3 pt. *Simple Synthesis of Reduction-Responsive Acrylamide-Type Nanogels for miRNA Delivery*. *Molecules*. 2023, 28, 761, DOI: 10.3390/molecules28020761. ($IF_{2022} = 4.600$, $MEiN = 140$

pkt.), doktorant potwierdził kolejny raz swoje kompetencje w zakresie syntezy polimerów, tym razem opracowując degradowalne kationowe nanożele akrylamidowe. W tym przypadku opracowane polimery były w stanie oddziaływać elektrostatycznie z ujemnie naładowanymi oligonukleotydami i zostały przetworzone w postać nanożeli załadowanych miRNA. Opracowane nanożele były pochłaniane przez komórki nowotworowe, co wskazuje na ich potencjał w kontekście terapii raka.

Prace nad opracowaniem nanożeli akrylowych załadowanych trehalozą doktorant opisał w kolejnym swoim artykule, mianowicie w publikacji 4 pt. *Trehalose-releasing nanogels: A step toward a trehalose delivery vehicle for autophagy stimulation*. *Biomater. Adv.* 2022, 138, 212969. DOI:10.1016/j.bioadv.2022.212969 (poprzednia nazwa czasopisma *Mater. Sci. Eng. C* z $IF_{2021} = 7.328$, $MEiN = 140$ pkt). W pracy tej oprócz dokładnego zaprojektowania struktury polimeru zastosował bardzo eleganckie podejście modyfikując trehalozę aby poprawić jej kompatybilność z matrycą hydrożelową. Jego badania wykazały, że opracowane nanożele cechuje wysoki współczynnik załadowania trehalozą (niemal 60%). Nanożele tworzą stabilne emulsje również w środowisku wzbogaconym w surowicę i uwalniają trehalozę w sposób kontrolowany, zależny od ich składu chemicznego i załadowania. Przeprowadzone badania wykazują, że najbardziej obiecująca formuła nie była cytotoksyczna względem komórek śródbłonna, nie wykazywała właściwości hemolizujących względem erytrocytów ale miała właściwości sprzyjające autofagii, co stwierdzono w badaniach na modelach dania prądkowanego i larwy muszki owocowej *Drosophila melanogaster*.

Ostatnia praca z cyklu publikacji pt. *Nanogels with covalently bound and releasable trehalose for autophagy stimulation in atherosclerosis*. *J. Nanobiotechnol.* 2023, 21, 472. DOI: 10.1186/s12951-023-02248-9 ($IF_{2022} = 10.200$, $MEiN = 140$ pkt.) prezentuje badania nad wykorzystaniem nanożeli z trehalozą w kierunku usuwania złogów miażdżycowych w naczyniach krwionośnych. Autor wykazał, że opracowane przez niego nanożele

zawierające niemal 60% kowalencyjnie związanej trehalozy mają wielkość ok. 50-60 nm, tworzą stabilne emulsje w środowisku wodnym wzbogaconym w białka osocza, dzięki czemu mogą być podawane dożylnie, zapewniają kontrolowane, jednorodne uwalnianie trehalozy, a także nie wykazują działania hemolizującego na erytrocyty. Przeprowadzone badania na modelu mysim wykazały, że opracowane formułacje są w stanie zredukować nawet o 60% wielkość płytki miażdżycowej.

Po zapoznaniu się z dysertacją nasuwa mi się drugie pytanie do dyskusji w trakcie publicznej obrony: *Jakie kolejne badania powinny być przeprowadzone, aby dostarczyć dalszych dowodów na aktywność biologiczną, bezpieczeństwo i skuteczność opracowanych przez niego nanożeli z trehalozą w dwóch aplikacjach przedstawionych w artykułach 4 i 5, czyli w leczeniu np. chorób centralnego układu nerwowego i leczeniu miażdżycy?*

Stwierdzam, że dysertacja doktorska pana mgr. inż. Ali Marufa pt. " *Trehalose releasing nanogels for autophagy stimulation*" bardzo dobrze wpisuje się w dyscyplinę nauki chemiczne, gdyż dotyczy opracowania metody otrzymywania nowej generacji nowych nanosystemów dostarczania trehalozy do komórek i tkanek zdolnych do stymulowania autofagii, co może być wykorzystane do leczenia chorób takich jak nowotwory czy miażdżyca, a w przyszłości również chorób neurodegeneracyjnych. Autor dodatkowo wykazał, że poprzez odpowiednie zaprojektowanie struktury łańcucha polimerowego jest w stanie otrzymać nanożele kationowe lub anionowe, które będą nadawały się do dostarczania innych leków. Rozprawa spełnia też wymagania stawiane rozprawom doktorskim wg. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1669, z późn. zm.). Praca doktorska oraz artykuły naukowe stanowiące cykl publikacji zostały przygotowane bardzo starannie i cechuje je bardzo wysoka jakość naukowa. Dodatkowo, to że zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach dowodzi, iż

przeszły już wnikliwy proces recenzji a nawet zdobyły uznanie środowiska naukowego objawiające się cytowaniami.

W związku z powyższym wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej oraz dopuszczenie pana mgr. inż. Ali Marufa do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Biorąc pod uwagę nowatorskie podejście doktoranta do tematu oraz końcowy efekt polegający na udowodnieniu potencjału aplikacyjnego otrzymanych nanformulacji, a także upowszechnienie swoich wyników w postaci artykułów w bardzo dobrych czasopismach – wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Podpisano odręcznie przez autora