

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Agnieszki Lasak
pt. *„Badanie właściwości biologicznych elektroprzędzonych nanowłókien PL-b-CL/PVP modyfikowanych nanocząstkami i białkami przeciwbakteryjnymi – ocena działania cytotoksycznego oraz aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej w badaniach in vitro”*

Nanomedycyna to dziedzina nauk medycznych wykorzystująca nanotechnologię do diagnozowania, leczenia i profilaktyki chorób. Spośród nanomateriałów, na uwagę zasługują elektroprzędzone polimerowe nanowłókna, które wykorzystywane są w inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej, kontrolowanym dostarczaniu leków, jak również jako materiały opatrunkowe i biosensory. Postuluje się też inne zastosowania nanowłókien polimerowych.

Przedstawiona do recenzji dysertacja pt. *„Badanie właściwości biologicznych elektroprzędzonych nanowłókien PL-b-CL/PVP modyfikowanych nanocząstkami i białkami przeciwbakteryjnymi – ocena działania cytotoksycznego oraz aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej w badaniach in vitro”* została przygotowana przez mgr Magdalenę Lasak w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach pod kierunkiem Dr hab. Karola Cieplucha.

Osiągnięcie będące podstawą do wnioskowania o stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne stanowi cykl trzech publikacji oryginalnych o sumarycznym współczynniku oddziaływania Impact Factor (IF) 13,7 i punktacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) równej 400:

1. Nirwan Viraj Pratap, **Lasak Magdalena**, Ciepluch Karol, Fahmi Amir. *Hybrid Nanomat: Copolymer Template CdSe Quantum Dots In Situ Stabilized and Immobilized within Nanofiber Matrix*, *Nanomaterials*, 2023, 13(4):630. DOI: 10.3390/nano13040630.
MNiSW: 100
IF: 4,4
2. **Lasak Magdalena**, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Łysek-Gładysińska Małgorzata, de la Mata Francisco Javier, Gomez Rafael, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. *Dendronized Ag/Au Nanomats: Antimicrobial Scaffold for Wound Healing Bandages*, *Macromolecular Bioscience*, 2024, 24(6):e2300513. DOI: 10.1002/mabi.202300513.
MNiSW: 100
IF: 4,4
3. **Lasak Magdalena**, Łysek-Gładysińska Małgorzata, Lach Karolina, Nirwan Viraj Pratap, Kuc-Ciepluch Dorota, Sanchez-Nieves Javier, de la Mata Francisco Javier, Fahmi Amir, Ciepluch Karol. *Electrospun Nanofibers for the Delivery of Endolysin/Dendronized Ag-NPs Complex Against Pseudomonas aeruginosa*, *Nanotechnology, Science and Applications*, 2025, 18:57-70. DOI: 10.2147/NSA.S498942.
MNiSW: 200
IF: 4,9

Układ dysertacji jest typowy dla tego typu monografii. Doktorat składa się z 11 części: wykazu skrótów, wykazu publikacji stanowiących rozprawę doktorską, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu, celu pracy, omówienia publikacji stanowiących rozprawę doktorską, wniosków końcowych, literatury uzupełniającej, dorobku naukowego, kopii publikacji oraz oświadczeń współautorów. Rozprawa została przygotowana z dużą starannością językową i edytorską.

We **wstępie** Doktorantka przybliży nanowłókna polimerowe jako innowacyjne materiały do zastosowań biomedycznych oraz omawia elektroprzędzenie, jako metodę wytwarzania nanowłókien. Wstęp napisany jest w sposób przemyślany i zwięzły, jednakże, w opinii recenzenta można go rozbudować o większą liczbę przykładów zastosowań nanowłókien w medycynie i farmacji.

Cel pracy został sformułowany prawidłowo. Było nim opracowanie nowych nanomateriałów na bazie elektroprzędzonych nanowłókien PL-b-CL/PVP modyfikowanych nanocząstkami i białkami przeciwbakteryjnymi oraz ocena ich właściwości fizykochemicznych i biologicznych. Doktorantka sformułowała także 3 cele szczegółowe, które w praktyce stanowiły kolejno realizowane zadania badawcze:

1. wytworzenie nanomateriałów, za pomocą elektroprzędzenia oraz przeprowadzenie ich odpowiedniej modyfikacji, zmierzających do opracowania poszczególnych nanowłókien:
 - a. PL-b-CL/PVP-CdSe QDs
 - b. PL-b-CL/PVP-AuNPs
 - c. PL-b-CL/PVP-AuNPs + Dend-AgNPs
 - d. PL-b-CL/PVP + Dend-AgNPs + endolizyna
2. wykonanie kompleksowej charakterystyki fizykochemicznej otrzymanych nanowłókien
3. wskazanie możliwości aplikacyjnych opracowanych nanomateriałów na podstawie oceny ich właściwości biologicznych, tj. przeciwbakteryjnych, przeciwnowotworowych oraz cytotoksycznych.

Tematyka badań jest aktualna, interdyscyplinarna i w pełni uzasadniona zarówno z naukowego, jak i klinicznego punktu widzenia.

Publikacje będące podstawą do wnioskowania o stopień doktora przygotowano zgodnie z wymogami edycyjnymi redakcji. W dwóch pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, natomiast w jednej – drugim autorem. Ponadto, w jednej z prac Kandydatka jest także autorem korespondencyjnym. Analizując **oświadczenia współautorów** należy zauważyć decydujący/znaczący udział Doktorantki w powstaniu poszczególnych artykułów. Brakuje jednak informacji, który z autorów przeprowadzał analizę statystyczną oraz opracował ryciny.

W pierwszej publikacji przedstawiono procedurę syntezy hybrydowych nanowłókien PL-b-CL/PVP modyfikowanych kropkami kwantowymi selenku kadmu (CdSe QDs) oraz dokonano charakterystyki fizykochemicznej i biologicznej otrzymanych nanomateriałów, wskazując na ich potencjalne działanie przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe. Badane nanowłókna, zwłaszcza PL-b-CL/PVP-CdSe QDs, hamowały wzrost *P. aeruginosa* oraz produkcję jego czynników wirulencji – plicyjaniny i piowerdyny. Właściwości cytotoksyczne nanowłókien zbadano na ludzkich komórkach nabłonka oskrzeli BEAS-2B i ludzkich komórkach raka płuc A549 stosując test MTS. Choć test MTS stanowi udoskonaloną wersję testu MTT, nigdy nie zastąpi badań

za pomocą cytometrii przepływowej czy mikroskopii fluorescencyjnej. Brakuje też uzasadnienia wyboru zastosowanych linii komórkowych. Dlatego też, wniosek na temat właściwości przeciwnowotworowych nanowłókien wydaje się być przesadzony. W pozostałych publikacjach cytotoksyczność nanowłókien oceniono już za pomocą obserwacji mikroskopowej oraz cytometrii przepływowej z wykorzystaniem testu FITC Annexin V.

W drugiej publikacji dokonano charakterystyki fizykochemicznej oraz biologicznej elektroprzędzonych nanowłókien PL-b-CL/PVP sfunkcjonalizowanych nanocząstkami złota (AuNPs). Określono wpływ modyfikacji nanorusztowania PL-b-CL/PVP-AuNPs dendronizowanymi nanocząstkami srebra (Dend-AgNPs) na jego skuteczność antybakteryjną oraz oceniono potencjał otrzymanych nanowłókien w kierunku rozwoju innowacyjnych opatrunków na rany. Nanowłókna PL-b-CL/PVP-AuNPs charakteryzowała niewielka cytotoksyczność wobec nienowotworowej linii komórkowej BEAS-2B, w przeciwieństwie do nanorusztowań PL-b-CL/PVP, które indukowały spadek żywotności komórek do 59%. Co ciekawe, mechanizm toksyczności nanowłókien nie był najprawdopodobniej związany z nadprodukcją reaktywnych form tlenu (RFT). W tekście pracy brakuje jednak odniesienia literaturowego do zastosowanej metody oceny tempa produkcji RFT. Pojawia się więc pytanie: jakie warunki reakcji zastosowano?

W trzeciej publikacji opracowano materiał o właściwościach przeciwbakteryjnych na bazie elektroprzędzonych nanowłókien PL-b-CL/PVP modyfikowanych dendronizowanymi nanocząstkami srebra (Dend-AgNPs) oraz białkiem pochodzenia bakteriofagowego – endolizyną. Wskazano na główne zalety z zastosowanej podwójnej modyfikacji nanowłókien w aspekcie wytworzenia innowacyjnego opatrunku do leczenia trudno gojących się ran i jednocześnie zapobiegającego zakażeniom wywoływanym przez bakterie wielolekooporne.

Zastosowana w badaniach **metodologia** nie budzi większych zastrzeżeń, umożliwiając powtórzenie eksperymentów. Nie zawsze jednak podano w ilu niezależnych eksperymentach wykonano badania na liniach komórkowych czy poszczególne oznaczenia biochemiczne. Pojawia się także pytanie: jakie testy statystyczne zastosowano do porównań?

Dyskusja wyników potwierdza znajomość ogólnej wiedzy teoretycznej Kandydatki w dyscyplinie. Literatura została dobrana prawidłowo oraz omówiona w sposób dojrzały i wyczerpujący. Pewien niedosyt recenzenta budzi

brak omówienia ograniczeń badań oraz dalszych planów badawczych. Dopełnieniem cyklu prac mogłaby być również praca przeglądowa podsumowująca aktualną wiedzę na temat wykorzystania nanowłókien polimerowych w medycynie i farmacji.

Z badań wyciągnięto następujące wnioski:

1. Dzięki precyzyjnie dobranym parametrom elektroprzędzenia otrzymano porowate, cylindryczne nanowłókna o satysfakcjonującej stabilności termicznej i mechanicznej, co potwierdziły wykonane analizy fizykochemiczne
2. Włączenie do nanowłókien PL-b-CL/PVP kropek kwantowych selenku kadmu (CdSe QDs) pozwoliło na wytworzenie nanomateriałów o właściwościach przeciwbakteryjnych skierowanych wobec lekoopornego *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 oraz istotnej aktywności przeciwnowotworowej
3. Powierzchniowa modyfikacja przeciwbakteryjnych nanowłókien PL-b-CL/PVP-AuNPs dendronizowanymi nanocząstkami srebra wzmacnia działanie antybakteryjne całego nanorusztowania wobec opornego na antybiotyki *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, a zastosowanie tych nanowłókien jako platformy do transportu Dend-AgNPs ogranicza cytotoksyczność tych nanocząstek w stosunku do ludzkich fibroblastów
4. Elektroprzędzone nanowłókna PL-b-CL/PVP modyfikowane Dend-AgNPs i endolizyną wykazują silne działanie przeciwbakteryjne wobec *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 hamując jego wzrost, produkcję czynników wirulencji i indukując uszkodzenia błony zewnętrznej i ściany komórkowej bakterii, a wykorzystanie tych nanowłókien jako nośnika dla Dend-AgNPs istotnie zmniejsza ich cytotoksyczność wobec fibroblastów.

Wnioski zostały sformułowane prawidłowo. Moje wątpliwości budzi jedynie wniosek 2 dotyczący właściwości przeciwnowotworowych nanowłókien PL-b-CL/PVP modyfikowanych kropkami kwantowymi selenku kadmu (CdSe QDs). Wyniki uzyskane za pomocą zastosowanych metod badawczych wskazują wyłącznie na potencjał takiego działania. Wszystkie wnioski odpowiadają jednak celom osiągnięcia.

Podsumowując, przedłożona do oceny rozprawa doktorska jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego, stanowi logiczną całość, posiada duże walory poznawcze oraz świadczy o dobrym przygotowaniu Kandydatki do samodzielnego prowadzenia działalności badawczej. Przedstawione

badania należy uznać za nowatorskie i przeprowadzone z użyciem nowoczesnego warsztatu badawczego. Mają one charakter aplikacyjny. Ponadto, należy podkreślić, iż monografia została przygotowana z dużą starannością, zarówno pod względem merytorycznym, jak i edytorskim.

Przytoczone w recenzji uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji – rozprawę uważam za istotne osiągnięcie naukowe zarówno Doktorantki, jak i Promotora.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, iż **rozprawa doktorska mgr Magdaleny Lasak pt. „Badanie właściwości biologicznych elektroprzędzonych nanowłókien PL-b-CL/PVP modyfikowanych nanocząstkami i białkami przeciwbakteryjnymi – ocena działania cytotoksycznego oraz aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej w badaniach *in vitro*”** spełnia wszystkie wymogi określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Stąd też zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach z wnioskiem o przyjęcie pracy i dopuszczenie mgr Magdaleny Lasak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku,



Dr hab. n. med. Mateusz Maciejczyk