

Łódź, dnia 28.08.2025 r.

Dr hab. n. biol. Joanna Kołodziejczyk-Czepas, prof. UŁ  
Katedra Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki  
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź  
tel. 42 635 44 83  
email: joanna.kolodziejczyk@biol.uni.lodz.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Agnieszki Lasak**

**„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”**

**realizowanej w toku kształcenia w Szkole Doktorskiej Uniwersytetu Jana  
Kochanowskiego w Kielcach**

Wzrastająca średnia długość życia, dynamiczny rozwój cywilizacji i zwiększona zapadalność na choroby cywilizacyjne stawiają w ostatnich dekadach coraz więcej wyzwań przed współczesną medycyną - zarówno w kontekście opracowania nowocześniejszych metod diagnostycznych, jak i skuteczniejszych oraz bezpieczniejszych terapii. Nanotechnologia umożliwia tworzenie różnych materiałów i struktur oraz modyfikowanie ich właściwości na poziomie molekularnym, co może przekładać się na powstanie bardziej swoistych i czulszych narzędzi diagnostycznych, a także na opracowanie precyzyjniejszych podejść terapeutycznych (DOI: 10.1155/2023/4838043). Nanocząstki i nanomateriały stanowią element współczesnej medycyny, a także jeden z kluczowych kierunków badań biomedycznych mających na celu opracowanie nowych terapii lub zwiększenie skuteczności obecnie stosowanych metod leczenia, w tym zwiększenie udziału terapii celowanej we współczesnej medycynie oraz opracowanie nowych systemów dostarczania leków, opatrunków bioaktywnych, czy materiałów używanych w medycynie regeneracyjnej (DOI: 10.1016/j.glohj.2023.02.008; 10.3390/molecules29112584; 10.1016/j.matpr.2020.05.380; 10.1016/j.nxnano.2024.100129). Jednocześnie wiadomo, że zastosowanie nanocząstek i innych nanomateriałów nie jest wolne od ryzyka wystąpienia efektów niepożądanych. Wiele nanomateriałów o obiecujących właściwościach fizyko-chemicznych nie spełnia oczekiwań

*JKE*

w aspekcie pożądanej aktywności biologicznej, a w konsekwencji jest wykluczanych z możliwości przejścia do etapu badań przedklinicznych i klinicznych, na przykład ze względu na słabą aktywność biologiczną, cytotoksyczność lub brak hemokompatybilności (DOI: 10.1016/j.jtemin.2025.100252; 10.3390/cells8101209; 10.1016/j.onano.2023.100190). Stąd też prace badawcze obejmujące tworzenie nanomateriałów oraz ocenę ich aktywności biologicznej i potencjalnej przydatności do zastosowań biomedycznych wymagają wielokierunkowego podejścia, z uwzględnieniem zarówno doboru ich optymalnej struktury przestrzennej, analiz właściwości fizycznych oraz chemicznych, jak i badań reaktywności w układach biologicznych. Przygotowana przez Panią mgr Magdalenę Lasak dysertacja dotyczy więc bardzo ważnego i aktualnego zagadnienia, a zawarte w niej wieloaspektowe podejście do nanowłókien wpisuje się w aktualny nurt prac badawczych z zakresu nanotechnologii i badań biomedycznych.

#### **Formalna i ogólna ocena pracy**

Przedstawiona do oceny praca doktorska obejmuje cykl trzech wieloautorskich publikacji oryginalnych, opublikowanych w czasopismach angielskojęzycznych, o łącznej wartości IF = 13,7 i łącznej punktacji MNiSW = 400. Prace opublikowano w uznanych w środowisku naukowym czasopismach z listy JCR, tj.: Nanomaterials (MDPI), Molecular Bioscience (WILEY), Nanotechnology, Science & Applications (DOVEPRESS/Taylor & Francis Group). W publikacji określonej jako pierwsza (Publikacja I) Doktorantka jest drugim, a dwóch pozostałych pracach pierwszym autorem. Dołączone do publikacji oświadczenia dotyczące jej roli w przygotowaniu publikacji oraz oświadczenia pozostałych współautorów są szczegółowe i jednoznacznie wskazują na znaczący udział Pani mgr Magdaleny Lasak w powstawaniu ww. prac.

Do publikacji dołączono obszerny autoreferat zawierający streszczenia (w języku polskim i angielskim), słowa kluczowe, wykaz skrótów, wstęp, omówienie celu badań objętych pracą, a także omówienie zawartości poszczególnych publikacji, w tym metod oraz wyników, ich krótką dyskusję oraz wnioski. Dysertacja zawiera ponadto szczegółowy wykaz dorobku naukowego Doktorantki, w tym informacje o publikacjach, stażach, udziale w konferencjach naukowych oraz innych aktywnościach powiązanych z działalnością naukową.

#### **Ocena merytoryczna pracy**

Zarówno opublikowane prace, jak i przygotowany przez Doktorantkę autoreferat charakteryzują się bardzo uporządkowaną i przejrzystą dla odbiorcy strukturą. Obszerny wstęp

w części autoreferatowej zawiera omówienie biomedycznych zastosowań nanowłókien polimerowych, w tym ich wykorzystania w biosensorach, materiałach opatrunkowych, inżynierii tkankowej, czy systemach dostarczania leków. Stanowi on bardzo dobre wprowadzenie do tematyki dysertacji i podkreśla aktualność oraz zasadność badań wchodzących w zakres pracy doktorskiej. W odniesieniu do zawartości wstępu, moją uwagę jako recenzentki zwróciły szczególnie aspekty związane z szeroko opisywanymi przez Doktorantkę zaletami nanowłókien syntetycznych (lub częściowo syntetycznych), w porównaniu z nanomateriałami opartymi na matrycach biologicznych polimerów - jak na przykład wspomniany w autoreferacie fibrynogen. Fibrynogen, a właściwie powstająca z niego fibryna, to jedno z białek najczęściej wykorzystywanych w celach biomedycznych - ze względu właśnie na właściwości mechaniczne, możliwość inkorporacji różnych składników do matrycy fibrynowej, biokompatybilność i biodegradowalność (DOI: 10.1177/20417314231190288). Ponadto, produkty degradacji fibrynogenu i fibryny charakteryzują się ważnymi właściwościami przyspieszającymi procesy regeneracyjne. Podobne zalety (przynajmniej częściowo) przypisuje się materiałom na bazie albuminy (DOI: 10.3390/ijms231810557). Dlatego też chciałabym zapytać Doktorantkę, jakie widzi ograniczenia w możliwościach biomedycznego zastosowania nanowłókien syntetycznych lub częściowo syntetycznych, które będą szczególnie trudne do wyeliminowania - lub używając personifikacji: w jakim zakresie materiały syntetyczne ustępują lub być może będą ustępowały nanomateriałom na bazie naturalnych polimerów?

W części autoreferatowej wskazano również jasny i precyzyjny cel pracy (wraz z celami szczegółowymi), a następnie Doktorantka płynnie przeszła do omówienia założeń badawczych, metodyki oraz głównych wyników badań objętych poszczególnymi publikacjami. Wnioski sformułowane przez Doktorantkę, zawarte w autoreferacie dysertacji, są prawidłowo sformułowane i odzwierciedlają uzyskane wyniki.

Wszystkie trzy publikacje stanowiące merytoryczny rdzeń dysertacji charakteryzują się wysokim poziomem naukowym, logiczną koncepcją badawczą oraz wykorzystaniem bardzo szerokiego panelu właściwie dobranych i nowoczesnych technik, stosowanych w badaniach właściwości fizyko-chemicznych różnych nanomateriałów i testach biomedycznych. Do badania właściwości fizyko-chemicznych zastosowano między innymi skaningową mikroskopię elektronową (SEM), transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM), technikę dynamicznego rozpraszania światła (DLS), spektroskopię osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (AFT-FTIR), skaningową kalorymetrię różnicową (DSC), analizy termogravimetryczne (TGA) i spektroskopię UV-Vis. Jako biologiczne modele badawcze zastosowano natomiast kilka linii komórkowych (BEAS-2B, A549, VH10 i THP-1) oraz patogen

*Pseudomonas aeruginosa* serotyp O1 (pałeczkę ropy błękitnej; PAO1), a wśród metodyki zastosowanej w badaniach aktywności biologicznej opracowanych nanowłókien znajdują się m.in. obrazowanie mikroskopowe (mikroskopia fluorescencyjna z wykorzystaniem testu LIVE/DEAD), pomiary żywotności komórek przy użyciu komercyjnych testów MTS Cell Proliferation Assay, płytkowe testy immunoenzymatyczne (ELISA) oraz cytometria przepływowa. Należy również podkreślić, że publikacje powstały jako efekt prac badawczych prowadzonych w obrębie międzynarodowego zespołu badaczy, we współpracy z ośrodkami zagranicznymi, przede wszystkim Rhine-Waal University of Applied Science w Niemczech i University of Alcalá w Hiszpanii.

Praca opublikowana w czasopiśmie *Nanomaterials* (2023, wskazana w dysertacji jako Publikacja I) obejmuje procedurę syntezy hybrydowych nanowłókien PL-b-CL/PVP modyfikowanych kropkami kwantowymi selenku kadmu (CdSe QDs), ich charakterystykę fizykochemiczną, badania właściwości przeciwbakteryjnych tego nanomateriału w stosunku do modelowego lekoopornego szczepu *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, a także ocenę ryzyka cytotoksyczności w oparciu o badania na linii ludzkich komórek nabłonka oskrzeli (linia BEAS-2B) oraz wstępną ocenę właściwości przeciwnowotworowych na podstawie badań przeprowadzonych na ludzkich komórkach raka płuc (linia A549). W toku prowadzonych doświadczeń Doktorantka wykazała, że badane nanowłókna, w szczególności PL-b-CL/PVP-CdSe QDs wykazują zdolność hamowania wzrostu kolonii badanego patogenu i produkcję jego czynników wirulencji. Nanowłókna PL-b-CL/PVP-CdSe QDs wyraźnie zmniejszały także żywotność komórek nowotworowych. Doktorantka wskazuje, że przygotowane i badane w ramach pracy nanomateriały są obiecującym produktem do stosowania miejscowego, posiadającym właściwości przeciwbakteryjne i przeciwzapalne. Ze względu na fakt, że jako modele doświadczalne wykorzystano linię komórkową nowotworu płuc oraz patogen będący czynnikiem atakującym głównie w obrębie układu oddechowego (szczególnie u pacjentów z mukowiscydozą), chciałabym zapytać, czy na tym etapie badań właściwości opracowanych nanowłókien Doktorantka mogłaby wskazać potencjalne kierunki zastosowania tego materiału w obrębie układu oddechowego, czy samej struktury płuc (np. rodzaj terapii). Czy już jakieś materiały o strukturze nanowłókien są w literaturze opisywane pod kątem zastosowania właśnie w terapii schorzeń dotyczących układu oddechowego?

Kolejna praca wchodząca w skład dysertacji, opublikowana w czasopiśmie *Macromolecular Bioscience* (2024; wskazana jako Publikacja II) obejmuje badania elektroprzędzonych nanowłókien PL-b-CL/PVP funkcjonalizowanych nanocząstkami złota (AuNPs) oraz wpływ modyfikacji nanorusztowania PL-b-CL/PVP-AuNPs dendronizowanymi nanocząstkami srebra (Dend-AgNPs) na właściwości biologiczne nanomateriału. Prace

badawcze prowadzono w kontekście oceny możliwości zastosowania badanego nanomateriału jako bioaktywnego składnika lub bazy do opatrunków na rany. Opracowany nanomateriał charakteryzował się aktywnością przeciwbakteryjną wobec *Pseudomonas aeruginosa* (szczep PAO1) i niską cytotoksycznością wobec fibroblastów. W badaniach Doktorantki zauważalna jest jednak immunoreaktywność nanowłókien PL-b-CL/PVP oraz nanowłókien funkcjonalizowanych nanocząstkami złota (PL-b-CL/PVP-AuNPs) - Ryc. 13/ Fig. 13 w Publikacji II. Immunoreaktywność oceniano na podstawie poziomu IL-1 $\beta$ , ale zastosowano jedynie próbę kontrolną ujemną - tj. komórki THP-1 nietraktowane badanymi materiałami. W autoreferacie, Doktorantka określa immunoreaktywność materiałów jako „nieznacznie zwiększoną” (str. 47 autoreferatu), ale wartości liczbowe charakteryzujące poziom IL-1 $\beta$  w komórkach traktowanych nanowłóknami PL-b-CL/PVP oraz PL-b-CL/PVP-AuNPs wynoszą 2-3-krotność wartości uzyskanych dla próby kontrolnej. W świetle tych obserwacji, zasadne byłoby przeprowadzenie dodatkowych badań pod kątem immunogenności, w tym użycie w dalszych badaniach nanowłókien również kontroli pozytywnej - komórek poddanych stymulacji prozapalnej/immunologicznej, aby dokładniej ocenić poziom immunoreaktywności wywołanej przez nanomateriał.

W dalszej części prowadzonych badań wykazano ponadto, że nanowłókna PL-b-CL/PVP-AuNPs mogą działać również jako platformy do transportu substancji o działaniu przeciwbakteryjnym - jak np. zastosowane w pracy dendronizowane nanocząstki srebra (Dend-AgNPs).

Badania Doktorantki objęte *Publikacją* III (Nanotechnology, Science and Applications, 2025), zamykającą dysertację, koncentrowały się na możliwościach zastosowania nanowłókien PL-b-CL/PVP jako potencjalnego składnika opatrunków na trudno gojące się rany. W pracy tej ocenie poddano zastosowanie podwójnie modyfikowanych nanowłókien PL-b-CL/PVP jako nośników dla substancji terapeutycznych o właściwościach przeciwbakteryjnych. Nanowłókna modyfikowano dendronizowanymi nanocząstkami srebra (Dend-AgNPs) oraz białkami pochodzenia bakteriofagowego (z grupy endolizyn). Doktorantka wykazała, że zastosowanie wyżej wspomnianej podwójnej funkcjonalizacji nanowłókien zmniejsza cytotoksyczność materiału wobec fibroblastów i nadaje im aktywność przeciwbakteryjną wobec *P. aeruginosa* PAO1.

W zakresie części autoreferatowej, z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia edytorskie, na przykład:

- w wykazie skrótów Autorka stosuje angielskojęzyczny skrót „ROS” jednocześnie posługując się polskojęzyczną nazwą „reaktywne formy tlenu” - w literaturze polskojęzycznej używa się skrótu RFT;

- brak wyjaśnienia skrótu ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) w wykazie skrótów;

- skrót PBS wyjaśniono jako „roztwór soli fizjologicznej (ang. phosphate-buffered saline)”, podczas gdy jest to buforowany fosforanami roztwór soli fizjologicznej;

- w wykazie publikacji wchodzących w zakres dysertacji nie wskazano, czy podany IF jest wskaźnikiem z roku opublikowania pracy, czy najnowszym dostępnym w bazie Clarivate/WoS;

- pojawiają się błędy językowe - np. „spectrum” zamiast „spektrum” w wersji polskojęzycznej streszczenia, czy sformułowanie „*Nanowłókna PL-b-CL/PVP*, ozdobione powierzchniowo *Dend-AgNPs i endolizyną...*”.

Wskazane uchybienia edytorskie nie wpływają oczywiście na moją ogólną, bardzo pozytywną ocenę dysertacji.

#### **Podsumowanie oceny pracy i wniosek końcowy**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Magdaleny Lasak obejmuje nowatorskie badania dotyczące właściwości nanowłókien oraz wpływu ich wybranych funkcjonalizacji na właściwości biologiczne, które mogą znaleźć zastosowanie w celach terapeutycznych. Konstrukcja pracy, jej założenia, jakość merytoryczna, właściwie dobrany i nowoczesny panel metodyczny, uzyskane wyniki oraz ich wnikliwa analiza zdecydowanie wskazują na oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Rozprawa doktorska przedłożona przez mgr Magdalenę Lasak spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 poz. 574). W związku z powyższym, wnioskuję o dopuszczenie mgr Magdaleny Lasak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Josune Koldanekaya-Cienas*