



dr hab. inż. Łukasz Kłapiszewski, prof. PP

WYDZIAŁ TECHNOLOGII CHEMICZNEJ
ul. Berdychowo 4, 60-965 Poznań, tel.: +48 61 665 37 48
e-mail: lukasz.klapiszewski@put.poznan.pl, www.put.poznan.pl

Poznań, 6.09.2021 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgra Adama Mielocha

z tytułu

„Synthesis and analysis at the nanoscale. Biomedical applications of nanotechnology on the example of virus-like particles with a magnetic core and nanoindentation”

wersja tytułu w języku polskim:

„Synteza i analiza w skali nano. Biomedyczne zastosowania nanotechnologii na przykładzie cząstek wirusopodobnych z magnetycznym rdzeniem oraz nanoindentacji”

Podstawa: Uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne UAM z dnia 9 lipca br. oraz stosowne pismo nr L. dz. WCH/265/JT/2021 z dnia 21.07.2021 r. Dziekana Wydziału Chemii UAM prof. dra hab. Macieja Kubickiego.

Podstawa prawna: zgodność z elementami uwzględnionymi w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgra Adama Mielocha została zrealizowana w Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Pracę wykonano pod kierunkiem Pana prof. UAM dra hab. inż. Jakuba D. Rybki, bardzo prężnie działającego specjalisty w zakresie wykorzystania nanomateriałów w biotechnologii oraz inżynierii biomedycznej.

W recenzji przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej Pana mgra Adama Mielocha wziąłem pod uwagę przede wszystkim trafność wyboru problemu badawczego, oryginalność i nowatorski charakter badań, a także wykorzystaną metodologię wraz z trafnością użycia do jej realizacji stosownych metod i technik pomiarowych. Aspektem dodatkowym oceny, choć także bardzo

istotnym z mojego punktu widzenia, pokazującym zaangażowanie Doktoranta w kreowaniu postępu naukowo-technologicznego, był dorobek naukowy.

Od kilkudziesięciu lat obserwuje się intensywny rozwój bardzo oryginalnej dziedziny nauki, jaką jest nanotechnologia. Ta dziedzina nauki swoją uniwersalność zawdzięcza połączeniu kilku nauk, w tym między innymi: fizyki, chemii, biologii, co umożliwia projektowanie coraz to nowszych, bardziej zaawansowanych produktów, znajdujących docelowe zastosowanie w medycynie, elektronice czy inżynierii materiałowej. Poszukiwanie nowatorskich rozwiązań w obrębie nanotechnologii stanowi wyzwanie naszych czasów, tak więc nie jest to już melodia przyszłości, ale opis teraźniejszości. To właśnie kluczowe zagadnienia w obrębie wyżej wspomnianego obszaru, stanowią domenę recenzowanej dysertacji doktorskiej Pana mgra Adama Mielocha. Świadczy to zatem jednoznacznie o aktualności problemu badawczego, jak i umiejętności doboru tematyki badawczej w aspekcie rozwoju badań podstawowych oraz ich przełożeniu na aspekt użyteczny.

Oceniana rozprawa doktorska została przedstawiona na 60 stronach maszynopisu w języku angielskim. Tytuł rozprawy został sformułowany poprawnie i odpowiada przedstawionym w ramach pracy rezultatom badań. Rozprawę doktorską otwiera jednostronicowe streszczenie pracy w języku polskim. Dalsza część pracy została podzielona na osiem części. W pierwszej części, Doktorant przedstawił ogólne cele pracy w rozdziale *General goals of the thesis*, następnie cele szczegółowe – *Specific goals of particular core scientific achievement*. Dalsze rozdziały to: dorobek naukowy (*Scientific achievements*) oraz życiorys naukowy (*Scientific resume*). Kolejno, Pan mgr Adam Mieloch zawarł: Wprowadzenie (*Introduction*), Komentarze do najważniejszych osiągnięć (*Core achievements commentaries*), Podsumowanie i perspektywy (*Summary and perspectives*) oraz Literaturę (*References*). Pracę domykają trzy załączniki stanowiące wykaz publikacji wchodzących w skład właściwego osiągnięcia naukowego Doktoranta.

Przedstawione przez Pana mgra Adama Mielocha elementy pracy są poprawnie ułożone i oznaczone, umożliwiając czytelnikowi właściwą orientację oraz przebrnięcie przez materiał badawczy w niej zawarty.

Pełen tytuł osiągnięcia naukowego zdefiniowanego przez Doktoranta brzmi: *Synthesis and analysis at the nanoscale. Biomedical applications of nanotechnology on the example of virus-like particles with a magnetic core and nanoindentation*, w wersji polskiej z kolei: *Synteza i analiza w skali nano. Biomedyczne zastosowania nanotechnologii na przykładzie cząstek wirusopodobnych z magnetycznym rdzeniem oraz nanoindentacji*. Jest on, jak już wspominałem, poprawnie określony i w pełni odnosi się do prezentowanych w rozprawie wyników badań i całego zawartego w niej materiału naukowego. Z kolei, głównym celem badań stanowiących podstawę pracy doktorskiej było zbadanie potencjału rozwiązań z obszaru syntezy i analizy w skali *nano*, do

zastosowań biomedycznych. Część pracy dotycząca syntezy opierała się na otrzymywaniu i funkcjonalizacji superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (SPION), ocenie ich właściwości biologicznych oraz wykorzystaniu do tworzenia cząstek wirusopodobnych (VLP) z magnetycznym rdzeniem. Z kolei część analityczna pracy opierała się na nanoindentacji ludzkiej chrząstki stawu kolanowego objętej chorobą zwyrodnieniową stawów.

Ważnym i istotnym, według recenzenta, było zdefiniowanie przez Autora szczegółowych celów badawczych pracy (powiązanych z konkretnymi publikacjami naukowymi, wchodzącymi w skład osiągnięcia), do których zaliczyć należy:

- (1) ewaluację *in vitro* superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza funkcjonalizowanych diheksadecylofosforanem (SPION-DHP). Badania w tym zakresie obejmowały syntezę i funkcjonalizację SPION-DHP, a następnie przeprowadzenie szeregu eksperymentów biologicznych mających na celu ocenę biokompatybilności otrzymanych nanocząstek. W ramach zrealizowanych eksperymentów przeprowadzono następujące analizy biologiczne: testy cytotoksyczności i proliferacji, test reaktywnych form tlenu, analizę wychwytu SPION (za pomocą barwienia żelazem i ICP-MS), analizę ekspresji genów. Do analizy RT-qPCR wybrano zestaw następujących genów: fosfatazę alkaliczną (ALPL); lekki łańcuch ferrytyny (FTL); białkową fosfatazę serynowo/treoninową 2A (PP2A); niereceptorową fosfatazę białkowej tyrozyny typu 11 (PTPN11) oraz receptor transferyny 1 (TFRC). Doświadczenia przeprowadzono na ludzkich liniach komórkowych pochodzących z raka SW1353 (chrzęstniakomięsak) i TCam-2 (nasieniak).
- (2) uzyskanie cząstek wirusopodobnych z rdzeniem magnetycznym złożonym z białka rdzeniowego wirusa zapalenia wątroby typu B (HBc) i funkcjonalizowanych SPION-ów. W ramach prowadzonych badań określono, że długość i ładunek związku powlekającego są kluczowe dla skuteczności składania i stabilności powstałych VLP, stąd, w ramach pracy, do funkcjonalizacji wybrano dwa związki: 1,2-distearoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[karboksy-(glikolpolietylenowy)-2000] i diheksadecylofosforan (DHP). Białko HBc otrzymano przez agroinfekcję *Nicotiana benthamiana* z plazmidem pEAQ-HBc. Otrzymane materiały oceniono z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej i testów immunoenzymatycznych ELISA.
- (3) przeprowadzenie badań nanoindentacji na próbkach ludzkiej chrząstki stawowej pobranych od pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów poddanych zabiegowi całkowitej alloplastyki stawu kolanowego. Głównym celem pracy było zbadanie korelacji pomiędzy stanem klinicznym pacjentów a właściwościami mechanicznymi usuniętej chrząstki stawu kolanowego. Badanie to zostało przeprowadzone na próbie 75 pacjentów. Próbkę chrząstki

z kłykci kości udowej zarówno o dużej masie (HWB), jak i niskiej (LWB) pobrano, a następnie przeanalizowano metodą nanoindentacji. Do tej pory nie odnotowano w literaturze danych naukowych dotyczących optymalnej metodologii przygotowania próbki, co jest kluczowe dla uzyskania wiarygodnych danych. W ramach przeprowadzonych badań uzyskane właściwości mechaniczne skorelowano z danymi klinicznymi pacjentów i poddano szczegółowej analizie statystycznej, dającej tym samym wgląd w postęp choroby zwyrodnieniowej stawów.

Do najważniejszych wniosków badawczych, które jednocześnie wyznaczają elementy nowości naukowej, a wynikają z przedłożonego do oceny osiągnięcia naukowego Pana mgra Adama Mielocha zaliczam:

- (1) otrzymanie oraz scharakteryzowanie superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (SPION) funkcjonalizowanych diheksadecylofosforanem (DHP) wraz z wnikliwą oceną ich właściwości biologicznych, pod kątem stworzenia efektywnego narzędzia do zastosowań biomedycznych;
- (2) wytworzenie cząstek wirusopodobnych z rdzeniem magnetycznym składających się z białka rdzeniowego wirusa zapalenia wątroby typu B i funkcjonalizowanych SPION-ów;
- (3) wskazanie, że nanoindentacja może przyczynić się do zapewnienia głębszego zrozumienia procesów zwyrodnieniowych stawów, przyczyniając się do rozwoju nowoczesnej medycyny.

Podsumowując, na podstawie wnikliwego przeglądu prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego Pana mgra Adama Mielocha stwierdzam, że zaprojektowane przez Niego eksperymenty, a także wyciągnięte na ich podstawie wnioski są kompletne i przyczyniają się do pogłębienia wiedzy w zakresie szeroko pojętej nanotechnologii w biomedycynie. Dodam, że nie chciałbym głębiej wnikać i komentować zbioru prac włączonych w cykl rozprawy doktorskiej, ze względu na to, że artykuły te poddane zostały już niezależnym recenzjom przez grono specjalistów w ramach cyklu recenzyjnego w obrębie konkretnych czasopism. Niemniej jednak chciałbym podkreślić, że zarówno synteza, jak i analiza uzyskanych produktów w skali nanometrycznej wymagają starannego ich przygotowania i przeprowadzenia, z czym według mojej oceny Doktorant dobrze sobie poradził. Powtórzę, za Doktorantem, że pomimo wielu inicjatyw badawczych poświęconych nanotechnologii, nadal brakuje powiązania między naukami podstawowymi, a konkretnym zastosowaniem w praktyce. Pan mgr Adam Mieloch właściwie starał się w swojej pracy te aspekty połączyć, co zasługuje na słowa uznania. Teoria bowiem z praktyką muszą być nierozłączne.

Chciałbym ponadto zaznaczyć, że Pan mgr Adam Mieloch kontynuuje swoją „naukową przygodę” rozwijając swoje zainteresowania o nowe aspekty, m.in. zastosowania nanotechnologii w druku 3D, powiązanych rzecz jasna z biomedycyną. Ten aspekt uznaję za szczególnie cenny

i życzę ważnych, a może i przełomowych osiągnięć w tym kierunku. Inne tematy realizowane przez Doktoranta są niemniej wartościowe.

Analizując wkład pracy w ramach wszystkich trzech publikacji przedłożonych do osiągnięcia naukowego nie mam wątpliwości, że Pan mgr Adam Mieloch jest ich głównym pomysłodawcą, a także realizatorem całego warsztatu eksperymentalnego oraz wreszcie osobą najbardziej zaangażowaną w ich finalne powstanie w obecnym kształcie. Sumaryczny *Impact Factor* wszystkich trzech prac to 12,203, zaś suma punktów ministerialnych to 350, co przedkłada się na relatywnie dobre wartości średnie, w przeliczeniu na jedną pracę, równe odpowiednio: 4,068 oraz 117.

Rozprawa doktorska zawiera pewne błędy edytorskie czy stylistyczne (brak znaków interpunkcyjnych, literówki, podwójne spacje *etc.*), których uważam, że nie ma większego sensu w tym miejscu przytaczać. Ponadto, na przyszłość, zwracam uwagę, aby staranniejsze wykonywać rysunki.

Ponadto, pozwolę sobie wskazać kilka kwestii dyskusyjnych, do których chciałbym, aby podczas publicznej obrony Autor się ustosunkował, a wynikają one z obowiązków recenzenta i dają pośrednio dowód na zapoznanie się z pracą:

1. Skąd pomysł na użycie w badaniach nanocząstek tlenku żelaza oraz ich funkcjonalizowanie diheksadecylofosforanem? Czemu akurat takie związki? Może warto także pomyśleć nad innymi nanocząstkami tlenków i wykonać badania porównawcze? Oczywiście to tylko sugestia na przyszłość.
2. Pod jakim kątem Doktorant dobierał pacjentów, aby następnie przeprowadzić badania nanoindentacji na próbkach ludzkiej chrząstki stawowej? Czy badania przeprowadzone na wskazanych 75 osobach są wystarczające? Czy może warto dokonywać tego typu badań na jeszcze szerszej grupie pacjentów?
3. Jakie jest zdanie Doktoranta związane z rozwojem nowoczesnej nanotechnologii w biomedycynie? W którym kierunku powinny podążać badania w najbliższym czasie? Co w krótkich słowach stanowi wartość priorytetową?

Wymienione powyżej komentarze są symboliczne i nie umniejszają mojej pozytywnej oceny recenzowanej rozprawy. Doktorant włożył w nią dużo zaangażowania i determinacji.

Na koniec, chciałbym pokrótce podsumować dotychczasową całkowitą aktywność naukową Pana mgr Adama Mielocha. Dorobek naukowy wyrażony jest w postaci łącznie 8 opublikowanych publikacji naukowych (3 publikacje wchodzi bezpośrednio w skład osiągnięcia naukowego, z kolei 5 dodatkowych nie jest związanych bezpośrednio w osiągnięciem). Ponadto Doktorant jest współautorem jednego zgłoszenia patentowego. Jeśli chodzi o wskaźniki naukometryczne to przedstawiają się one następująco: sumaryczny *Impact Factor*: 22,81; liczba cytowań: 56; całkowita

liczba punktów ministerialnych: 870 pkt oraz indeks Hirscha: 5 – wszystkie wyszczególnione dane były aktualne na moment składania pracy doktorskiej. Choć na tym etapie pracy naukowej wskaźniki nie odgrywają jeszcze tak istotnej roli to trzeba przyznać, że są one dobre, z roku na rok z pewnością będą piąć się w górę. Dodatkowo, Doktorant brał udział w kilku konferencjach naukowych prezentując wyniki swoich badań w formie prezentacji ustnych oraz posterowych. Ponadto, Pan mgr Adam Mieloch odbył staż naukowy w *Institute of Cancer Research*, London (Wielka Brytania) – zespół naukowy *Preclinical Molecular Imaging* dr Gabrieli Kramer-Marek. Dodatkowo, odbył dwa krótkie staże w ośrodkach zagranicznych w Utrechcie oraz Berlinie. Na szczególną uwagę zasługuje ponadprzeciętne zaangażowanie Doktoranta w realizację licznych projektów naukowych finansowanych przez różne agendy, w tym m.in. Narodowe Centrum Nauki (programy MAESTRO i OPUS – oba kierowane przez prof. dr hab. Michała Giersiga) oraz Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (programy LIDER czy TECHMATSTRATEG – kierowane lub koordynowane przez promotora dysertacji prof. UAM Jakuba D. Rybkę).

Wyszczególnione przeze mnie wyżej osiągnięcia są jedynie najważniejszymi, które w swoim dorobku posiada Pan mgr Adam Mieloch, widać wyraźnie, że Jego zaangażowanie w liczne projekty i nowe przedsięwzięcia uległo w ostatnim czasie znacznemu zintensyfikowaniu.

Podsumowując, chciałbym wyraźnie zaznaczyć widoczny wkład Pana mgra Adama Mielocha w rozwój uprawianej dyscypliny naukowej, w szczególności w projektowanie i zastosowanie nowoczesnych nanotechnologii w biomedycynie. Sposób zaplanowania eksperymentów, zrealizowania badań, jak i forma przedstawienia wyników oraz ich analiza, świadczą o kompetencjach naukowo-badawczych Doktoranta i są dowodem Jego odpowiedniego poziomu przygotowania do prowadzenia badań naukowych czy pracy w przemyśle medycznym lub pokrewnym.

Na podstawie oceny pracy doktorskiej Pana mgra Adama Mielocha zatytułowanej „*Synthesis and analysis at the nanoscale. Biomedical applications of nanotechnology on the example of virus-like particles with a magnetic core and nanoindentation*” oraz wersja tytułu w języku polskim: „*Synteza i analiza w skali nano. Biomedyczne zastosowania nanotechnologii na przykładzie cząstek wirusopodobnych z magnetycznym rdzeniem oraz nanoindentacji*” stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia wszystkie wymogi formalne i zwyczajowe w świetle istniejącego prawa.

Wniosuję zatem do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne UAM o przyjęcie pracy i przeprowadzenie dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jakub Kłapiewski