

Poznań, 5.09.2020 r.

Wydział Chemii
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu

Dr hab. n. med. Tomasz Piontek
Pracownia Medycyny Sportu.
Klinika Chirurgii Kręgosłupa i Ortopedii Dziecięcej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Recenzja Rozprawy Doktorskiej Magistra Adama Mielocha

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

1. Znaczenie podjętej tematyki

Przedstawiona do recenzji praca doktorska obejmuje w swojej merytorycznej części streszczenie w języku polskim, ogólne cele pracy, cele szczegółowe poszczególnych podstawowych osiągnięć naukowych, życiorys Doktoranta, wprowadzenie, komentarz Doktoranta do przedstawionych osiągnięć, podsumowanie i możliwości rozwoju przedstawionych osiągnięć naukowych, piśmiennictwo oraz załączniki: trzy prace będące podstawą osiągnięcia naukowego Doktoranta:

1. Bioevaluation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Spions) functionalized with dihexadecyl phosphate (DHp) IF = 4.576 MNiSW = 140 pkt
2. Assembly and Characterization of HBc Derived Virus-like Particles with Magnetic Core IF = 4.324 MNiSW = 70 pkt
3. Osteoarthritis Severely Decreases the Elasticity and Hardness of Knee Joint Cartilage: A Nanoindentation Study IF = 3.303 MNiSW = 140 pkt

Łączna wartość IF = 12,202 i 350 punktów MNiSW

Praca została napisana w języku angielskim. Łącznie praca doktorska zawiera 60 stron maszynopisu, w tym 9 rycin, a spis piśmiennictwa zawiera 21 pozycji.

Zgodnie z wymaganiami ustawowymi, stawianymi rozprawom doktorskim, powinny one stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego (...) oraz wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej¹". Mając to na uwadze, przy ocenie rozprawy doktorskiej magistra Adama Mielocha przyjęto następujące kryteria: znaczenie podjętej tematyki, poprawność w sformułowaniu celów i hipotez badawczych, metodyka badań, struktura rozprawy oraz jej strona warsztatowa¹.

2. Znaczenie podjętej tematyki

Podjęta przez Doktoranta tematyka potencjału syntezy i analizy w nanoskali do zastosowań biomedycznych jest bardzo aktualnym tematem w wielu dziedzinach nauki, szczególnie w naukach biomedycznych. Coraz większy wzrost uszkodzeń chrząstki stawowej zmusza ludzi nauki do zastanowieniem się nad zwiększeniem przewidywalności skutków zmiany morfologii komórki w tkankach. Możliwości, jakie daje nam nanoskala w ocenie morfologii komórki i tkanek, pozwolą w niedalekiej przyszłości na stworzenie szeregu instrumentów umożliwiających szybka diagnostykę choroby zwyrodnieniowej narządu ruchu. Tym tematem zajął się Doktorant w trzecim przedstawianym osiągnięciu naukowym. W swoim pierwszym osiągnięciu naukowym prezentowanym w cyklu prac, Doktorant przeprowadził ocenę *in vitro* supermagnetycznych nanocząsteczek tlenku żelaza. Badania obejmowały syntezę i funkcjonalizacje SPION DHP oraz ocenę biokompatybilności otrzymanych nanocząsteczek. W drugim opublikowanym doniesieniu naukowym prezentowanym jako cykl prac, Doktorant przedstawił uzyskanie cząstek wirusopodobnych z rdzeniem magnetycznym złożonym z białka rdzeniowego wirusa zapalenia wątroby typu B (HBc) i funkcjonalizowanych SPIONów. Zastosowanie cząstek wirusopodobnych z rdzeniem magnetycznym, ich ustabilizowanie i powtarzalność tworzenia w przyszłości może zaowocować wykorzystania platformy VLP w tworzeniu szczepionek, ukierunkowaniu zewnętrznego leczenia zmian nowotworowych czy przenoszeniu leków w organizmie celem bardziej kierunkowego ich działania.

Doktorant w sposób przejrzysty przedstawił ocenę biologiczną właściwości SPIONów powlekanych DHP, funkcje ujemnych ładunków powierzchniowych i właściwości hydrofilowych, z powodzeniem wykorzystanych w badaniu cząstek wirusopodobnych z rdzeniem magnetycznym.

¹ Art. 13.1. *Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki*, Dz. U. nr 65, poz. 595, z późn. zm.

3. Cele pracy i hipotezy badawcze

Problem badawczy, cel główny rozprawy, cele cząstkowe i hipotezy badawcze Doktorant poruszył we wstępnych rozdziałach pracy, a ich rozwinięcie szczegółowo zostało przedstawione w trzech załączonych pracach składających się na osiągnięcie naukowe Doktoranta. Cele i hipotezy badawcze przedstawione w pierwszej pracy dotyczyły tworzenia i *in vitro* supermagnetycznych nanocząsteczek tlenku żelaza (SPION-DHP), ich stabilności oraz oceny biokompatybilności otrzymanych cząsteczek. W drugiej pracy celem Doktoranta była synteza i ocena supermagnetycznych nanocząsteczek w białku rdzeniowym wirusa zapalenia wątroby typu B (HBc). Celem trzeciej pracy było zbadanie korelacji pomiędzy stanem klinicznym pacjentów a właściwościami mechanicznymi chrząstki stawowej w badaniu nanoindentacji.

4. Metodyka badań i materiał badań

Metodyka badań w poszczególnych częściach dotyczyła tworzenia przez Doktoranta koncepcji eksperymentu, syntezy i funkcjonalizacji supermagnetycznych nanocząsteczek tlenku żelaza, badania cytotoksyczności, analizy danych eksperymentu tworzenia nanocząsteczek, łączenia nanocząsteczek z cząsteczkami wirusopodobnymi, opracowania metodyki przygotowania próbki nanowycięcia chrząstki stawowej, przeprowadzenia eksperymentu z nanoindentacją i analizy danych.

5. Struktura rozprawy

Struktura rozprawy jest poprawna i zgodna z koncepcją badawczą. Praca składa się z streszczenia w języku polskim, 8 rozdziałów, 3 załączników, które stanowią 3 osiągnięcia naukowe oraz spisu piśmiennictwa. Pierwszy rozdział ma charakter teoretyczny, drugi ma charakter metodyczny, a trzeci empiryczny.

Teoretyczna część rozprawy skupia się na przedstawieniu problemu badawczego, wyjaśnieniu pojęcia nanotechnologii i wprowadzeniu czytelnika do szczegółów powstawania ciał wirusopodobnych z rdzeniem magnetycznym. Części metodyczne i empiryczne w każdym doniesieniu szczegółowo opisuje wyniki przeprowadzonych badań. W badaniu pierwszym, SPIONy zsyntetyzowano przez termiczny rozkład żelaza (III) acetyloacetonianu $\text{Fe}(\text{acac})_3$ i funkcjonalizowano fosforanem diheksadecylu (DHp) poprzez przeniesienie fazowe. Bioaktywność SPION-DHp oceniano na liniach komórkowych pochodzących z raka SW1353 i TCam-2. Przeprowadzono następujące testy: test cytotoksyczności i proliferacji, test reaktywnych form tlenu (RoS), wychwyty SPIONs (poprzez barwienie żelazem i ICP-MS), analizę ekspresji następujących genów: fosfatazy alkalicznej (ALPL); łańcuch lekki ferrytyny (FTL); fosfataza białkowa serynowo-treoninowa 2A (PP2A); niereceptorowa białkowa fosfataza tyrozynowa typu 11 (PTPN11); receptor transferyny 1 (TFRC) przez Rt-qpcR. Uzyskano z powodzeniem nanocząstki SPION-DHp, które nie

wykazały istotnej cytotoksyczności w zakresie badanych stężeń. Generowanie ROS było podwyższone, ale nie skorelowane ze stężeniami. Profil ekspresji genów był nieznacznie zmieniony tylko w komórkach SW1353.

W drugim doniesieniu, w części metodycznej i empirycznej Doktorant badał zespoły białka kapsydu wirusa zapalenia wątroby typu B (HBc) w cząstkach wirusopodobnych z superparamagnetycznymi nanocząstkami tlenku żelaza (SPION) jako rdzeniem magnetycznym w odniesieniu do ich właściwości. Natywną formę HBc otrzymywał przez agroinfekcję *Nicotiana benthamiana* plazmidem pEAQ-HBc. SPIONy o średnicy 15 nm z zsyntetyzowanym i sfunkcjonalizowanym za pomocą dwóch ligandów, zapewniając różnorodność potencjału i średnicy hydrodynamicznej. Potencjał antygenowy zmontowanych rdzeniowych VLP oceniał za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA). Morfologia SPION i rdzeniowych VLP została oceniona za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Najbardziej udany układ rdzeń-VLP uzyskał dla SPION funkcjonalizowanych fosforanem diheksadecylu (DHP) przy stosunku SPIONs/HBc wynoszącym 0,2/0,05 mg/ml. Wyniki testu ELISA wskazały na znaczny spadek antygenowości towarzyszący składaniu się rdzenia-VLP. Podsumowując, badanie przedstawione w drugiej pracy składającej się na cykl, dostarcza eksperymentalnej oceny kluczowych parametrów kierujących montażem VLP SPION-HBc i ocenia antygenowość otrzymanych struktur.

W trzeciej pracy składającej się na cykl, w części metodycznej i empirycznej Doktorant przedstawił metodę nanoindentacji do określenia modułu sprężystości i twardości chrząstki stawowej kolana. Od pacjentów z rozpoznaniem choroby zwyrodnieniowej stawów (OA) pobierano próbki chrząstki z kłykci kości udowych zarówno z dużym obciążeniem (HWB), jak i niskim (LWB). Średni moduł sprężystości chrząstki HWB wyniósł $4,46 \pm 4,44$ MPa w porównaniu z obszarem LWB ($9,81 \pm 8,88$ MPa, $p < 0,001$). Podobnie twardość była istotnie niższa w tkance HWB ($0,317 \pm 0,397$ MPa) niż w chrząstce LWB ($0,455 \pm 0,434$ MPa, $p < 0,001$). Po dostosowaniu do wieku pacjentów, średni moduł sprężystości i twardość były istotnie niższe w grupie wiekowej powyżej 70 lat ($p < 0,001$). Istotną statystycznie różnicę w parametrach mechanicznych Doktorant stwierdził w 3. i 4. stopniu OA. Metodyka i rezultaty pracy pozwalają zasugerować Doktorantowi o możliwości prowadzenia dalszych badań nad chrząstką stawową osób bez zmian zwyrodnieniowych, by określić twardość i sprężystość chrząstki zdrowej. Pozwoli to uzyskać wiedzę w zakresie skali nano, mającą odzwierciedlenie w przyszłych badaniach nad chrząstką rekonstruowaną. Przeniesienie metodyki do badań nad łąkotkami zdrowymi, leczonymi pozwolą rozpowszechnić przedstawioną metodykę badań.

6. Strona warsztatowa – ocena formalna

Strona warsztatowa opiniowanej rozprawy magistra Adama Wielocha zasługuje na pozytywną ocenę. Pracę cechuje kompleksowość i wnikliwość przedstawionych problemów badawczych będących głównymi celami pracy. Doktorant wyczerpująco przedstawia analizę badanego materiału. Wnioski pracy odpowiadają dokładnie na zadane w celach pracy pytania.

7. Konkluzja końcowa

Analiza całości recenzowanej rozprawy doktorskiej magistra Adama Mielocha pozwala na stwierdzenie, iż stanowi ona ważną część wiedzy nad problemem nanoskali w aspekcie supermagnetycznych nanocząsteczek tlenku żelaza, cząstek wirusopodobnych z rdzeniem magnetycznym złożonym z białka rdzeniowego wirusa zapalenia wątroby typu B (HBc) i funkcjonalizowanych SPIONów oraz nanoindentacji do określenia modułu sprężystości i twardości chrząstki stawowej

Biorąc pod uwagę wszystkie przyjęte kryteria oceny, stwierdzam iż recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska magistra Adama Mielocha „**Synteza i analiza w skali nano. Biomedyczne zastosowania nanotechnologii na przykładzie cząstek wirusopodobnych z magnetycznym rdzeniem oraz nanoindentacji**” odpowiada warunkom stawianym tego typu opracowaniom. Wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o nadanie magistrowi Adamowi Mielochowi tytułu Doktora Nauk oraz wyróżnienie powyższej rozprawy.

Z wyrazami szacunku



dr hab. n. med. Tomasz Piontek

5762839

dr hab. n. med. Tomasz Piontek
specjalista w ortopedii
i traumatologii narządu ruchu
tel. 602 29 46 31