

Lublin, 2.09.2022

**Recenzja**

rozprawy doktorskiej **Pani magister Magdaleny Kowalskiej**  
pt. „**Badanie wpływu wybranych polimerowych pochodnych 1,2-distearoilo-*sn*-glicero-3-fosfatydyloetanolaminy oraz lipoidu kationowego na właściwości fizykochemiczne monowarstw i dwuwarstw lipidowych w kontekście opracowania składu efektywnych nośników leków**”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Magdaleny Kowalskiej została wykonana w Zespole Fizykochemii Powierzchni w Zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem Pana dr hab. Pawła Wydro, prof. UJ. Celem przeprowadzonych badań było zbadanie wpływu wybranych polimerowych pochodnych 1,2-distearoilo-*sn*-glicero-3 fosfatydyloetanolaminy oraz lipoidu kationowego na właściwości fizykochemiczne monowarstw i dwuwarstw lipidowych w kontekście opracowania składu efektywnych nośników leków. W swoich badaniach Autorka wykorzystwała technikę monowarstw Langmuira do termodynamicznej analizy interakcji pomiędzy PEG-yłowanymi lipidami, lipoidem kationowym i lipidami błon zwierzęcych, co stanowiło punkt wyjścia do przewidywania właściwości pęcherzyków lipidowych o analogicznym składzie, a w późniejszym etapie umożliwiło skorelowanie ich z wynikami uzyskanymi z badań przeprowadzonych na formułacjach liposomowych (płynność, przepuszczalność czy organizacja molekularna). Dodatkowo w pracy określono wpływ PEG-yłowanych lipidów na organizację molekularną bardziej złożonego układu, który swoim składem lipidowym odzwierciedlał budowę raftów lipidowych w błonach zwierzęcych.

Początki badań nad systemami kontrolowanego uwalniania leków sięgają lat 50tych XX wieku. Podawanie leków z systemów terapeutycznych o kontrolowanej szybkości uwalniania pozwala na pozostanie przez cały czas w oknie terapeutycznym i bardzo często zapewnia transport substancji leczniczej dokładnie do miejsca zmienionego chorobowo. Dzięki temu zmniejsza się ryzyko występowania niepożądanych skutków ubocznych oraz zmniejsza dawkowanie leku. Ponadto, zastosowanie nośnika usprawnia przenikanie leku przez biomembrany oraz przyspiesza jego dyfundowanie przez błonę plazmatyczną, w efekcie czego pozwala na szybsze dostarczenie substancji czynnej do chorej tkanki. Pomimo wielu korzyści wynikających z zastosowania systemów kontrolowanego uwalniania leków sam jego wybór uzależniony jest od wielu czynników i nadal stanowi duże wyzwanie projektowe. Materiał, z którego wykonany jest nośnik leku musi być biozgodny, biodegradowalny, umożliwiać enkapsulację dużej ilości leku w matrycy oraz zachować stabilność leku w warunkach



fizjologicznych przez długi okres czasu. Zaproponowane przez Doktorantkę badania znakomicie wpisują się w trend badań nad poszukiwaniem coraz doskonalszych systemów dostarczania leków.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska licząca 246 numerowanych stron została przygotowana w języku polskim w formie standardowego wydruku i podzielona w sposób typowy dla prac eksperymentalnych, tj. na część literaturową obejmującą 7 rozdziałów oraz część doświadczalną składającą się z 11 rozdziałów. Część teoretyczną pracy poprzedza wykaz stosowanych skrótów i symboli oraz wprowadzenie i cel pracy. W części literaturowej Autorka opisała metody dostarczania leków, scharakteryzowała liposomy ze szczególnym uwzględnieniem liposomów kationowych i liposomów PEG-ylowanych oraz scharakteryzowała błony biologiczne i stosowane obecnie modele błony komórkowej. Część doświadczalna obejmuje spis wykorzystanych odczynników, metodykę sporządzania roztworów, opis przeprowadzonych eksperymentów, wykaz analizowanych układów, a następnie wyniki badań oraz ich interpretację. Część tę kończy zwięzłe podsumowanie stanowiące syntetyczne ujęciem wniosków wynikających z przeprowadzonych badań. Praca zakończona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim, wykazem cytowanej literatury, suplementem oraz wykazem osiągnięć Autorki. Na podkreślenie zasługuje przedstawienie na końcu każdego rozdziału części doświadczalnej wniosków wynikających z badań przeprowadzonych w danym układzie.

Badania prowadzone były w sposób niezwykle spójny i logiczny. Natomiast do najważniejszych osiągnięć wynikających z ich przeprowadzenia należy wykazanie:

- I. Wzrostu płynność monowarstw lipid – polimer na granicy faz woda/powietrze wraz ze wzrostem długości polimerowego łańcucha. Fakt ten związany jest bezpośrednio z polarnością łańcucha poli(glikolu etylenowego), która jest tym większa im wyższy stopień PEG-ylacji DSPE.
- II. Zależności organizacji molekularnej i oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy badanymi koniugatami lipid – polimer a fosfolipidami budującymi membrany komórek zwierzęcych (DPPC, DPPE, DPPS), jak również właściwości fizykochemicznych monowarstw i dwuwarstw fosfolipid/DSPE-PEGn od stopnia PEG-ylacji DSPE, budowy polarnej głowy cząsteczki fosfolipidu błonowego oraz zawartości poszczególnych składników układów dwuskładnikowych, tj.
  - wzrost stopnia kontrakcji powierzchni w przypadku wprowadzenia zwitterjonowych cząsteczek DPPC do monowarstwy DSPE-PEGn, tym większy im niższy stopień PEG-ylacji DSPE.
  - ekspansję powierzchni przypadającej na pojedynczą cząsteczkę w przypadku inkorporacji bardzo małych stężeń ujemnie naładowanego DSPE-PEG750 do monowarstwy DPPS, wynikającą z jednoimienności ładunku elektrycznego DPPS i PEG-ylowanego lipidu.

Znalazło to odzwierciedlenie w układach dwuwarstwowych o analogicznym składzie dla których średnica hydrodynamiczna wzrasta wraz z ułamkiem molowym DSPE-PE750, a przepuszczalność dwuwarstwy otaczającej wodny rdzeń liposomów jest większa dla każdego dodatku lipopolimeru w porównaniu z niezmodyfikowanymi pęcherzykami DPPS.

- wzrost przepuszczalności membran fosfolipidowych wraz ze wzrostem stężenia polimerowego modyfikatora wprowadzonego do ich struktury, co jest powiązane z silnie upłynniającym wpływem PEG-yłowanych lipidów na dwuwarstwy fosfolipidowe. Skala tego zjawiska ściśle zależy od długości łańcucha poli(glikolu etylenowego) – dla PEG350 zmiany przepuszczalności w porównaniu z niezmodyfikowanymi liposomami są znikome. W przypadku dłuższych łańcuchów PEG (PEG750 i PEG2000), w wyniku znacznie większego ekranowania powierzchni pęcherzyków przez długie łańcuchy PEG2000 wyciek kalceiny z wnętrza pęcherzyków fosfolipid/DSPE-PEG<sub>n</sub> jest utrudniony w stosunku do modyfikacji liposomów za pomocą PEG750.
- III. Istotnego wpływu typu modyfikacji monowarstw oraz dwuwarstw fosfolipidowych – jeden rodzaj PEG-yłowanego lipidu bądź mieszanina krótko- oraz długołańcuchowego DSPE-PEG<sub>n</sub>, na ich właściwości fizykochemiczne, tj.
- wzrost stabilność termodynamicznej monowarstw dwuskładnikowych utworzonych przez cząsteczki fosfatydylocholiny posiadającej w swojej strukturze nasycony i nienasycony łańcuch węglowodorowy oraz molekuł lipopolimeru wraz ze stopniem PEG-ylacji DSPE. Również w układach trójskładnikowych, w których monowarstwa POPC modyfikowana była za pomocą mieszaniny DSPE-PEG350/DSPE-PEG2000 i DSPE-PEG750/DSPE-PEG2000.
  - zmniejszenie wartości średniej średnicy hydrodynamicznej pęcherzyków wraz ze wzrostem stężenia polimerowego modyfikatora w dwuwarstwie POPC/lipopolimer, wynikające z zakrzywania ich powierzchni przez rosnącą ilość łańcuchów poli(glikolu etylenowego) zlokalizowanych w przeważającej ilości po zewnętrznej stronie dwuwarstwy otaczającej wodny rdzeń formułacji liposomowych. Zmodyfikowanie liposomów POPC za pomocą mieszaniny krótko- oraz długołańcuchowego polimerowego modyfikatora zwiększa tzw. stałą grubość warstwy wodnej (FALT) otaczającej pęcherzyk liposomowy, co znajduje odzwierciedlenie w nieznacznie większych średnich średnicach hydrodynamicznych formułacji liposomowych w stosunku do liposomów zmodyfikowanych tylko jednym rodzajem PEG-yłowanego lipidu.
  - wprowadzanie coraz większej ilości ujemnie naładowanych cząsteczek DSPE-PEG<sub>n</sub>/mieszaniny DSPE-PEG<sub>n</sub> do dwuwarstwy fosfatydylocholiny zmienia wartość potencjału elektrokinetycznego tworzonych formułacji liposomowych w kierunku bardziej ujemnych wartości.

- IV. Zależności interakcji międzycząsteczkowych pomiędzy lipidem kationowym, lipidem pomocniczym (POPC) oraz badanymi koniugatami lipid-polimer, jak również właściwości fizykochemicznych jedno- oraz dwuwarstwowych układów kationowych od zawartości oraz długości polimerowego łańcucha skoniugowanego z DSPE, tj.
- w układach POPC/DC-Chol/lipopolimer charakter oddziaływań międzycząsteczkowych uwarunkowany jest stopniem PEG-ylacji DSPE. W mieszaninach zawierających najkrótsze łańcuchy PEG350 oddziaływania są mniej przyciągające niż w odpowiednich czystych filmach jednoskładnikowych, co wynika z obserwowanego również w układach dwuskładnikowych POPC/DSPE-PEG350 oraz DC-Chol/DSPE-PEG350 zjawiska penetrowania polarnej części monowarstwy przez trudniej desorbujące się krótkie łańcuchy PEG350. Trudność desorbowania łańcuchów poli(glikolu etylenowego) zmniejsza się wraz z ich długością, co pozwala na coraz ściślejsze upakowanie cząsteczek w układach POPC/DC-Chol/DSPE-PEG750 i POPC/DC-Chol/DSPE-PEG2000, i w efekcie pojawienie się coraz silniej przyciągających oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy ich komponentami.
  - przepuszczalność błon kationowych POPC/DC-Cholesterol zmienia się znacząco w wyniku zmodyfikowania ich struktury za pomocą molekuł koniugatu lipid-polimer. Przepuszczalność niezmodyfikowanych dwuwarstw kationowych POPC/DC-Cholesterol dla cząsteczek kalceiny wzrasta wraz ze stężeniem lipidu kationowego w układzie, czego przyczyną może być budowa grupy hydrofilowej lipidu kationowego, która w porównaniu do grupy polarnej cholesterolu jest znacznie większa i obdarzona dodatnim ładunkiem. Wprowadzenie ujemnie naładowanych cząsteczek DSPE-PEG<sub>n</sub> obniża ładunek elektrostatyczny kationowych formułacji liposomowych, co znacząco ogranicza ich przepuszczalność.
- V. Wzmacniania oddziaływań pomiędzy składnikami monowarstwy modelowego raftu lipidowego POPC/Chol/SM w wyniku inkorporacji cząsteczek koniugatów lipid-polimer (DSPE-PEG350, DSPE-PEG750). Wzmacnianie to jest tym większe im wyższy stopień PEG-ylacji 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfatydyloetanoloaminy. Główną przyczynę tego zjawiska należy upatrywać w osłanianiu cząsteczek cholesterolu przed środowiskiem wodnym, które w dużej mierze są molekułami niepolarnymi, przez łańcuchy poli(glikolu etylenowego), których polarność rośnie wraz z długością polimerowej części DSPE-PEG<sub>n</sub>.
- VI. Zmniejszenia płynności, a co za tym idzie uporządkowanie łańcuchów acylowych, zarówno monowarstwy, jak i dwuwarstwy modelowego raftu lipidowego w wyniku dodatku polimerowego modyfikatora DPE-PEG<sub>n</sub>. Płynność monowarstwy oraz dwuwarstwy POPC/Chol/SM rośnie wraz ze wzrostem stężenia DSPE-PEG<sub>n</sub> w układzie, jak również wraz

ze wzrostem stopnia PEG-ylacji 1,2-distearoilo-*sn*-glicero-3-fosfatydyloetanolaminy, co jest wynikiem rosnącej polarności badanego układu.

VII. Istotnego wpływu obecności cząsteczek PEG-yłowanego lipidu w dwuwarstwie POPC/Chol/SM na jej przepuszczalność, która zależy w głównej mierze od stężenia lipopolimeru w układzie oraz długości polimerowego łańcucha. Bardzo niewielkie dodatki koniugatu lipid-polimer (2% mol) zmniejszają przepuszczalność liposomów POPC/Chol/SM, czego powodem jest oplatanie powierzchni liposomów przez łańcuchy poli(glikolu etylenowego), w przypadku których, przy niewielkiej ich ilości odpychanie steryczne pomiędzy nimi jest zminimalizowane. Rosnąca ilość oraz długość polimerowego łańcucha PEG w dwuwarstwie otaczającej wodny rdzeń liposomów zwiększa moc odpychania sterycznego między nimi, co prowadzi do zmiany ich konformacji na powierzchni liposomów (rozciągnięcie w kierunku środowiska zewnętrznego) i zwiększenia przepuszczalności formulacji liposomowych.

VIII. Zależności rozmiaru oraz potencjału dzeta tworzonych formulacji liposomowych od stężenia oraz stopnia PEG-ylacji DSPE, tj.

- zmniejszenie średniej średnicy hydrodynamicznej liposomów w wyniku wprowadzania coraz większej ilości cząsteczek DSPE-PEG<sub>n</sub> do dwuwarstwy otaczającej wodny rdzeń liposomów;
- przesunięcie wartości potencjału dzeta liposomów w kierunku bardziej ujemnych wartości wraz ze wzrostem stężenia ujemnie naładowanego PEG-yłowanego lipidu w dwuwarstwie liposomów.

Doktorantka osiągnęła wyznaczone cele a uzyskane wyniki są bardzo interesujące i wykazują aspekt aplikacyjny. Na podkreślenie zasługuje próba przewidywania właściwości liposomów na podstawie termodynamicznej analizy właściwości monowarstw Langmuira o analogicznym składzie. Doktorantka udowodniła, że potrafi samodzielnie prowadzić badania naukowe i prawidłowo interpretować wyniki. Ponadto, całościowy dorobek naukowy mgr Magdalena Kowalskiej obejmuje 5 oryginalnych artykułów opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR oraz 24 doniesienia konferencyjne.

Podczas lektury rozprawy doktorskiej nasunęły mi się drobne uwagi:

- str. 14 „Asocjacja leku do powierzchni dendrymeru...” czy nie bardziej zasadne byłoby użycie zwrotu przyłączenie?
- str. 22 „Większość dyspersji koloidalnych w ośrodku wodnym zawiera ładunek elektryczny” Czy dyspersja „zawiera” ładunek? Czy może wykazuje ładunek?
- W równanie 1 (str. 23) występuje edycyjna pomyłka w postaci zapisu  $F$  zamiast  $f$ .
- str. 76 „można zauważyć istnienie dwóch maksimów (28 mN/m oraz 249 mN/m). Najprawdopodobniej nastąpiła edycyjna pomyłka drugiej ze wskazanych wartości.

- str. 84 „Wartości DI mniejsze niż 0,1 wskazują, że otrzymane formułacje liposomowe charakteryzują się małym rozkładem wielkości (monodispersyjność) oraz dużą stabilnością, która zapobiega ich agregacji”. Stabilność nie zapobiega agregacji. Stabilność układu koloidalnego jest wynikiem braku agregacji. Chodziło zapewne również o PDI.
- w przypadku opisu zmian wartości potencjału dzeta bezpieczniej jest posługiwać się wartością bezwzględną lub np. stosować stwierdzenie, że potencjał dzeta zmierza w kierunku wartości coraz bardziej ujemnych/dodatnich. Zapis „Zmniejszenie parametru  $\zeta$  jest prawdopodobnie spowodowane dodaniem ujemnie naładowanych cząsteczek DSPE-PEG<sub>n</sub>...” (str. 84) sugeruje, że układ będzie mniej stabilny. Z danych przedstawionych w tabeli 2 wynika, że przyjmuje on coraz większe wartości bezwzględne, sugerujące wzrost stabilności badanego układu.
- str. 116 ” W przypadku układów o stosunkowo krótkich łańcuchach PEG (POPC/DSPE-PEG350 oraz POPC/DSPE-PEG2000)...” chodziło raczej o POPC/DSPE-PEG350 oraz POPC/DSPE-PEG750.
- czy Autorka może wyjaśnić bardziej szczegółowo przyczyny zwiększonej przepuszczalności liposomów POPC/DC-Chol wynikające z dodatniego ładunku membrany względem ujemnie naładowanych cząsteczek kalceiny?

Przedstawione uwagi w żaden sposób nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy, która stanowi oryginalne opracowanie aktualnego problemu naukowego i prezentuje wysoki poziom merytoryczny.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Kowalskiej stanowi oryginalne opracowanie aktualnego problemu naukowego i spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim. Wniosuję zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

