



Zachodniopomorski
Uniwersytet
Technologiczny
w Szczecinie

INSTYTUT POLIMERÓW



Zakład Biomateriałów i Technologii
Mikrobiologicznych
Al. Piastów 45, 71-311 Szczecin

prof. dr hab. inż. Mirosława El Fray

tel: (+48) 91 499 48 28
fax: (+48) 91 499 40 98
Email: mirfray@zut.edu.pl

Ocena pracy doktorskiej pani mgr Urszuli Kwolek

**pt.: „Pęcherzykowe struktury polimerowe oraz
oddziaływania polimerów z membranami lipidowymi”**

Promotor: dr hab. Mariusz Kępczyński

Problematyka wykorzystania polielektrolitów jako stabilnych nośników leków lub jako liposomów oraz wektorów w terapii genowej stanowi jeden z aktualnych kierunków rozwoju nowoczesnych układów polimerowych zdolnych do selektywnego oddziaływania z błoną komórkową lub sztuczną membraną lipidową. Szczególnie odnosi się to do polikationów i polianionów wprowadzonych już do stosowania w technikach medycznych, jednak wciąż wymagających różnych modyfikacji zwiększających ich stabilność i pozwalających na formowanie np. struktur pęcherzykowych o wysokiej biogodności i trwałości.

Zapewne wyżej wymienione przesłanki zaważyły o podjęciu tematyki pracy doktorskiej przez mgr Urszulę Kwolek, realizowanej w Zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii w Zespole Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem dr hab. Mariusza Kępczyńskiego.

Cel naukowy rozprawy Doktorantka przedstawiła już we wstępie pracy, wskazując na wyraźnie zarysowane dwa obszary badawcze: wykorzystania zmodyfikowanych polielektrolitów do formowania liposomów i poznania mechanizmów ich oddziaływania z membraną lipidową (modelową lub biologiczną) oraz wytwarzania i badania struktur pęcherzykowych zwanych PICsomami, wytwarzanych z kopolielektrolitów i zdolnych do

zamykania w nich modelowych substancji (barwników, nanocząstek). Cel pracy zatem został jasno sformułowany, a praca eksperymentalna dobrze zaplanowana. Mgr Urszula Kwolek postawiła przed sobą zadanie opracowania wielu struktur polimerowych dla potencjalnych zastosowań w chemii, medycynie lub nanotechnologii. Warto podkreślić, że oprócz prac empirycznych Doktorantka wykorzystwała symulacje komputerowe oparte o metodę dynamiki molekularnej dla lepszego opisanie i zrozumienia mechanizmów badanych oddziaływań.

Wyniki swoich badań doktorantka zawarła w czterech opublikowanych pracach w prestiżowych czasopismach: *Langmuir* (IF=3.993), dwie prace w *Journal of Phys Chem B* (IF=3.187) oraz w *Polimerach* (IF=0.718). Wprowadzenie w tematykę rozprawy, tj. budowę błon biologicznych i modelowych membran lipidowych oraz charakterystykę badanych polimerów i struktur polimerosomowych i koacerwatów Autorka zawarła na 31 stronach przeglądu literaturowego (niefortunnie nazwanego jednak w pracy częścią teoretyczną), opartego na bogatej literaturze przedmiotu (Autorka zacytowała w swej pracy 197 materiałów źródłowych, stanowiących oryginalne prace badawcze). Układ pracy nie jest klasyczny, gdyż nie wyodrębnia osobnych rozdziałów poświęconych opisowi metod badawczych oraz przedstawienia wyników i ich dyskusji, ale zawiera się w sześciu rozdziałach poświęconych poszczególnym, zamkniętym cyklom badań składającym się na spójną całość.

Pokrótko omówię najważniejsze osiągnięcia doktorantki, zwracając uwagę na ich oryginalność oraz znaczenie poznawcze i aplikacyjne.

W pierwszej części swojej pracy zawartej w czterech rozdziałach, Doktorantka zajęła się modyfikacją polielektrolitów, tj. polietylenoiminy i kwasu hialuronowego oraz badaniami oddziaływania wytworzonych struktur z monowarstwami lipidowymi i liposomami. W swoich pracach Doktorantka wykorzystwała najnowocześniejsze techniki stosowane do oceny budowy chemicznej i właściwości polimerów, w tym ^1H NMR, GPC, SEC-MALS, SEM, cryoTEM, LSCM, mikroDSC, DLS. Warto podkreślić, że bogaty warsztat badawczy, obejmujący stanowiska i metody do badań cienkich warstw (waga Langmuira, mikroskopia kąta Brewstera) Doktorantka wzbogaciła o symulacje metodą dynamiki molekularnej, wskazując na dużą zgodność uzyskanych wyników badań empirycznych z wynikami symulacji. Zastosowanie wielu komplementarnych technik pozwoliło Doktorantce na przeprowadzenie badań nad właściwościami fizykochemicznymi i biologicznymi pęcherzyków polimerowych tzw. PICsomów otrzymywanych z pary kopolielektrolitów blokowych. Autorka wykazała wyjątkową stabilność takich struktur, co powinno znaleźć zastosowanie w konstruowaniu np. nośników leków. Kierunek zastosowań opracowanych przez Doktorantkę materiałów w technikach medycznych znalazł potwierdzenie w wysokiej biogodności udowodnionej na poziomie badań komórkowych. Tym samym Autorka wskazała na istotny aspekt nie tylko poznawczy, ale też i aplikacyjny przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej badań. Dodatkowo, w zakresie badania oddziaływania polimerów z naturalnymi membranami Doktorantka przeprowadziła ocenę oddziaływań wybranych polimerów z komórkami bakterii.

Ważnym osiągnięciem poznawczym pracy było opisanie mechanizmu oddziaływania pomiędzy cząsteczkami lipidów DPPC i DOPA budującymi membranę, a następnie opisanie wpływu wybranych polimerów na właściwości membran lipidowych. Autorka przeprowadziła badania stopnia hydratacji polimerów i powiązała je z oddziaływaniami z membraną lipidową wskazując, że polimer może adsorbować się na powierzchni membrany (zwitterjonowej lub anionowej) lub wnikać do wnętrza membrany anionowej, zmieniając jednocześnie położenie lipidów.

Interesującym zagadnieniem, którym zajęła się również Doktorantka, była ocena oddziaływań kwasu hialuronowego (HA) i jego pochodnych z monowarstwą lipidową. Autorka wykazała, że pochodne HA adsorbują się na liposomach zwitterjonowych i anionowych, w zależności od pH środowiska.

Zupełnie inaczej zachowują się PICsmy – pęcherzyki polimerowe. Są one stabilne w całym zakresie pH i w temperaturze 10 – 70 °C oraz nie ulegają degradacji pod wpływem surfaktanta niejonowego. W odróżnieniu od liposomów nie ulegają one również rozpadowi pod wpływem białek surowicy krwi. Ma to ogromne znaczenie praktyczne, gdyż biorąc pod uwagę ich wysoką biogodność komórkową i zdolność zamykania różnych modelowych substancji (barwników fluorescencyjnych, nanocząstek tlenku żelaza), są to niezwykle obiecujące materiały do zastosowań medycznych.

Dokonując oceny merytorycznej pracy stwierdzam, że jest ona napisana na bardzo dobrym poziomie. Analiza literatury zamieszczonej w spisie materiałów źródłowych jest dogłębna i wskazuje na dobre poruszanie się doktorantki w przedmiocie stanowiącym przedmiot rozprawy.

Podczas redagowania tak obszernego opracowania (161 stron maszynopisu) Autorka nie ustrzegła się drobnych uchybień i nieścisłości. Wskaźnik IC_{50} odnosi się do minimalnego stężenia hamującego a nie inhibującego, jak pisze Doktorantka. Skrót GPC najczęściej tłumaczy się jako chromatografia żelowa, a SEC jako chromatografia wykluczania. Doktorantka często używała określenia „symulacje dynamiką molekularną” co jest oczywiście skrótem myślowym w odniesieniu do symulacji komputerowych opartych o metodę dynamiki molekularnej. Te i kilka innych drobnych uchybień i literówek znalezionych w pracy w żaden sposób nie obniżają mojej bardzo wysokiej oceny pracy Doktorantki. Istotnym pytaniem nasuwającym się po analizie wyników jest to w jaki sposób (zgodnie z jakim modelem kinetycznym) uwalniałyby się leki z tak stabilnych PICsomów? Prosiłabym o ustosunkowanie się do tego zagadnienia podczas obrony.

Podsumowując uważam, że mgr Urszula Kwolek z powodzeniem zrealizowała postawiony przed sobą cel pracy. Uzyskała cenne wyniki dotyczące poznania oddziaływań w układach: polimer – membrana oraz pogłębiła wiedzę na temat pęcherzyków otrzymanywanych w oparciu o kompleksy polijonowe (tzw. PICsomy). Warto podkreślić, że doktorantka zrealizowała plan badawczy w sposób bardzo kompleksowy: od wytworzenia układów

modelowych membran i modyfikacji polimerów po bardzo dobre scharakteryzowanie ich struktury i właściwości fizyko-chemicznych aż po testy biogodności *in vitro*.

Uwzględniając aspekt poznawczy i aplikacyjny pracy, uważam, że stanowi ona istotny wkład do wiedzy na temat oddziaływań wybranych polielektrolitów z modelowymi bądź biologicznymi membranami lipidowymi oraz właściwości pęcherzyków polimerowych otrzymywanych na podstawie kopolielektrolitów blokowych. Warto nadmienić, że oprócz 4 prac, na których opiera się zasadniczy trzon rozprawy doktorskiej, mgr Urszula Kwolek jest współautorką 2 innych pełnotekstowych publikacji. O istotnej aktywności naukowej Doktorantki świadczy udział w dwóch projektach badawczych finansowanych z NCN (w tym grantu Preludium dla młodych naukowców) oraz projektu POIG finansowanego w ramach funduszy EFRR.

Biorąc pod uwagę osiągnięte wyniki i sposób ich interpretacji uważam, iż przedłożona do recenzji praca doktorska mgr Urszuli Kwolek pt. „Pęcherzykowe struktury polimerowe oraz oddziaływania polimerów z membranami lipidowymi” odpowiada w pełni wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim w świetle ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym (art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. Dz.U. z 2003 r., nr.65, poz. 595 z późniejszymi zmianami), dlatego wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Urszuli Kwolek do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę duże walory poznawcze pracy, a zwłaszcza wnikliwe opisanie i wyjaśnienie oddziaływań polielektrolit – błona lipidowa z wykorzystaniem różnego typu membran (monowarstwy Langmuira, liposomy, błony komórek fibroblastów i bakterii) potwierdzone empirycznie i symulacjami komputerowymi metodą dynamiki molekularnej oraz spełnienie wymogów w sprawie wyróżniania rozpraw doktorskich, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Urszuli Kwolek.



Mirosława El Fray

Szczecin, 17.03.2017 r.