



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni  
im. Jerzego Habera  
Polskiej Akademii Nauk



Dr hab. Krzysztof Szczepanowicz  
Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni  
im. Jerzego Habera  
Polskiej Akademii Nauk

Kraków 05.08.2018r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Wilkosz pt. „Nanomateriały polimerowe i lipidowe – otrzymywanie i zastosowanie jako nośniki substancji bioaktywnych”**

Rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Wilkosz, zatytułowana „Nanomateriały polimerowe i lipidowe – otrzymywanie i zastosowanie jako nośniki substancji bioaktywnych”, powstała w zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii w zespole Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Promotorem pracy jest dr hab. Mariusz Kępczyński.

Nanonauka, czyli nauka o obiektach o skali nanometrycznej, integrująca w sobie fizykę, chemię, inżynierię materiałową jest obecnie jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin działalności badawczej, a nanomedycyna wykorzystująca badania tego typu dla uzyskania nowych leków i materiałów o znaczeniu terapeutycznym jest jednym z wiodących nurtów nanonauki. Zastosowanie osiągnięć z zakresu nanotechnologii daje możliwość uzyskiwania nowych materiałów, których skład może być kontrolowany na poziomie pojedynczych cząsteczek, a rozmiary i struktura – na poziomie nanometrów. Zastosowanie nanocząstek/nanonośników dla celów terapeutycznych, a w szczególności do kontrolowanego transportu i uwalniania substancji aktywnych, jest jednym z wiodących nurtów nanonauki/nanomedycyny. W przeciwieństwie do tradycyjnych preparatów leczniczych, których największą słabością jest brak pełnej selektywności, nanoterapeutyki mogą mieć

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska  
tel. +48 12 639 51 01, +48 12 425 19 23  
fax +48 12 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego  
PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004  
NIP: 6750001805, REGON: P-000326351



Institut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni  
im. Jerzego Habera  
Polskiej Akademii Nauk

KNO | Krajowy Naukowy  
Ośrodek Wiedzy

zdolność działania w organizmie pacjenta we właściwym miejscu i w określonym czasie. Podawanie leków w postaci kapsułkowej przedłuża okres ich działania, polepsza biogodność, umożliwia kontrolę wydzielanej dawki, a odpowiednia modyfikacja materiału powłoki kapsułki pozwala na uwalnianie leku w odpowiednim miejscu organizmu, co powinno wyeliminować poważne skutki uboczne, czy nawet działanie toksyczne. Ponadto odpowiednia modyfikacja kapsułek np. poprzez immobilizację ligandów kierunkowych lub zastosowanie tzw. sterowania magnetycznego, pozwala na osiągnięcie tzw. „intelligent targeting”, czyli dostarczania i uwalniania leku w odpowiednim miejscu i czasie w organizmie. W nurt tych badań znakomicie wpisują się badania podjęte w pracy doktorskiej Pani mgr Natalii Wilkosz, przeprowadzone w zakresie syntezy i charakterystyki struktur pęcherzykowych zbudowanych z lipidów (tzw. Liposomów) oraz z blokowych kopolimerów amfifilowych (tzw. Polimerosomów), oraz badaniu ich właściwości.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Wilkosz liczy 167 stron, 66 rysunków 11 tabel, oraz 177 pozycji literaturowych. Rozprawa ta ma raczej tradycyjny charakter. Zawiera **streszczenie w języku polskim i angielskim**, kilkustronicowe **Wprowadzenie oraz cele pracy**, **Część teoretyczną**, **Część doświadczalną** oraz **Podsumowanie pracy**. Po podsumowaniu znajduje się rozdział zatytułowany **Bibliografia**. Praca została opatrzona **wykazem skrótów i oznaczeń**, **spisem rysunków** oraz **tabel** umieszczonych zaraz po **Spisie treści**, części te ułatwiają czytelnikowi jej studiowanie. Zamieszczony na końcu pracy **wykaz dorobku naukowego** Autorki obejmuje współautorstwo 5 artykułów o zasięgu międzynarodowym, w tym trzech już opublikowanych, jednym w recenzji oraz jednym wysłanym do czasopisma. W trzech z tych artykułów Pani Natalia jest pierwszym autorem. Należy tu nadmienić, że są to publikacje w bardzo dobrych czasopismach m.in. Journal of Physical Chemistry B z ACS. Na dotychczasowy dorobek Doktorantki składa się również 27 prezentacji konferencyjnych, na polskich jak i zagranicznych konferencjach (25 prezentacji plakatowych oraz 2 prezentacje ustne). Pani mgr Natalia Wilkosz odbyła również 3 staże naukowe, w tym jeden cztero-miesięczny w Instytucie Maxa Plancka w Niemczech w ramach projektu ETIUDA finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, brała też udział w 4 projektach, dwóch jako kierownik (Etiuda 5

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska  
tel. +48 12 639 51 01, +48 12 425 19 23  
fax +48 12 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego  
PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004  
NIP: 6750001805, REGON: P-000326351



oraz Wydziałowy Fundusz Projektów Doktoranckich), i dwóch jako wykonawca (projekty OPUS 4 i 11).

We **Wprowadzeniu**, **celach pracy** oraz w **Części teoretycznej**, stanowiących ok. 30 stron, Doktorantka dokonała zwięzłego podsumowania aktualnego stanu wiedzy dotyczącego systemów dostarczania leków, z szczególnym uwzględnieniem nośników leków hydrofobowych. Bardziej szczegółowo opisane zostały nośniki, którymi Doktorantka zajmowała się w swojej pracy czyli liposomy oraz polimerosomy. Następnie Autorka przedstawiła charakterystykę badanych substancji bioaktywnych: porfiryny używanej jako fotosensybilizator do terapii fotodynamicznej, piroksikamu - leku przeciwzapalnego oraz itrakonazolu – lek przeciwgrzybiczego. **Część teoretyczna** kończy się przybliżeniem wybranych metod eksperymentalnych wykorzystywanych do charakterystyki nanonośników. Opisane zostały Mikroskopia Cryo-TEM, mikroskopia Kąta Brewstera, Waga Langmuira oraz podstawy teoretyczne fluorescencyjnego rezonansowego przeniesienia energii (FRET). Czytając **Wprowadzenie** i **Część teoretyczną** natknąłem się na kilka błędów edycyjnych, które z obowiązku recenzenta podaję poniżej:

- str. 29, wprowadzenie i cele pracy: „Praktyczne stosowanie nośników leków do celów biomedycznych daje dużą nadzieję, ponieważ już w chwili obecnej są rozpowszechnione”
- str. 34, opis nośników, Koniugaty nośnik – lek, Doktorantka używa sformułowania „typowe leki”, typowe czyli jakie?
- str. 35, odwołanie do rysunku 2 przedstawiającego różne struktury systemów dostarczania leków znalazło się w akapicie opisującym mikrocząstki jako nośniki leków
- str. 37, prosiłbym o wyjaśnienie sformułowania „zmniejszona objętość dystrybucji”
- str. 40, zdanie „Liposomy można podzielić również ze względu na skład lipidów oraz mechanizm dostarczania” oraz tytuł tabeli 1 Podział liposomów ze względu na skład lipidów oraz mechanizm dostarczania. Mechanizm dostarczania czego?
- str. 41, Tabela 2, tytuł metody otrzymywania liposomów, a w nagłówku tabeli mamy LIPIDY



- str. 45, Polimerosomy, jak również liposomy, są szeroko opisane, jako nośniki substancji zamkniętych w ich wnętrzu, co pozwala uniknąć wielu efektów ubocznych spowodowanych wnikaniem leku do organizmu.
- str. 45, Wysoka zdolność akumulacji barwników oraz możliwość bezpośredniego wstrzyknięcia polimerosomów pozwala na wizualizację guzów *in vivo* w komórkach szczura [61]. (...) Polimerosomy otrzymywane z biodegradowalnych i biozgodnych kopolimerów mogą być wykorzystane do opracowania małych stabilnych komórek, które mogą znaleźć zastosowanie nie tylko do osadzenia białka na błonie, ale także prowadzić do funkcjonalnych zastosowań medycznych. Enkapsulacja enzymów w pęcherzykach polimerowych i kontrolowana przepuszczalność polimerowej membrany były badane pod kątem wykorzystania polimerosomów w biokatalizie [62,63]. Zastosowanie pęcherzyków polimerowych jest jeszcze mało opisane, ale prowadzone są obszerne badania w tym względzie.
- str. 50, Elektrony mocno penetrują materię, dlatego można badać tylko cienkie próbki o grubości nie większej niż 0,5  $\mu\text{m}$ . Kontrast w TEM uzyskuje się przez interakcję elektronów z badanym materiałem, dlatego często próbki są pokrywane ołowiem, uranem lub platyną w celu poprawy kontrastu. w badaniach TEM stosuje się najczęściej napięcia od 80 do 200 kV.
- Brakuje mi opisu metod stosowanych w części doświadczalnej np. DLS, LDV, dlaczego tylko wybrane metody zostały opisane?

Na podstawie przeglądu literatury przedstawionego w części teoretycznej Pani mgr Natalia Wilkosz postanowiła wnieść swój wkład w rozwój nowych nano-nośników/nanocząstek do zastosowań jako systemy dostarczania leków. W tym miejscu warto kilka słów poświęcić formie **Części doświadczalnej** pracy, która to w istotny sposób odbiega od typowej pracy doktorskiej. Przedstawia ona wyniki opisane w publikacjach Autorki, nie będąc przy tym typowym zbiorem tych artykułów. **Część doświadczalna** składa się z czterech rozdziałów, każdy z nich poświęcony jest osobnym zagadnieniom.

W pierwszym z nich Doktorantka bada oddziaływanie czynnika aktywnego piroksikamu z liposomami, do badań użyto tzw. konwencjonalnych liposomów oraz liposomów



pegylowanych. Doktorantka wykonała doświadczenia oraz komplementarne symulacje komputerowe metodami dynamiki molekularnej. Analizując otrzymane wyniki Doktorantka wnioskuje, że cząsteczki piroksikamu wnikają do błon konwencjonalnych oraz pegylowanych liposomów. Co więcej, korona PEG wokół pęcherzyków lipidowych może służyć jako dodatkowa objętość do akumulacji cząsteczki leku w sterycznie stabilizowanych liposomach, zwiększając w ten sposób wydajność dostarczania leku. Do tych części mam pewne uwagi i pytania:

Uwagi:

- str. 61, opis metody otrzymywania olbrzymich liposomów, co to są teflonowe spacery
- str. 62, Pomiar stałej przyłączania, Umknęła mi informacja dotycząca czasu inkubacji wymaganego do osiągnięcia równowagi, znalazłem tylko informację, że został określony przed eksperymentami.

Pytania:

- **Chciałbym prosić o przedyskutowanie preferencyjnego lokowania się leku w warstwie PEG. Skoro w przypadku konwencjonalnych liposomów także obserwowano dwa maksima w profilach gęstości masy, to czy można mówić o tym, że warstwa PEG może służyć jako dodatkowa objętość do akumulacji cząsteczek leku. Czy nie jest to ułożenie leku na powierzchni liposomu?**

W drugim rozdziale Pani mgr Wilkosz skupiła się na badaniu oddziaływań hydrofobowo zmodyfikowanych liniowych polikationów z dwuwarstwą zwitterjonową. Także w tym rozdziale Doktorantka oprócz doświadczeń przeprowadziła komplementarne symulacje komputerowe. Wykazała, że zmodyfikowane hydrofobowo polikationy łatwo adsorbują się na dwuwarstwie lipidowej. Dodatkowo długość bocznych grup alkilowych jest istotnym parametrem w przypadku adhezji polikationu na powierzchni liposomu, podczas gdy stopień podstawienia łańcuchami alkilowymi wpływa na zdolność polimerów do penetracji błony. Poniżej uwagi i pytania:



Uwagi:

- str. 75, Wstęp do rozdziału 2 części doświadczalnej, „co również zaobserwowano w poniższym rozdziale”, proponowałbym „opisano w poniższym rozdziale”
- str. 88, badania wpływu polimerów
- str. 95, głównego łańcucha głównego
- str. 96, Łańcuchy alkilowe wnikały do hydrofobowego regionu dwuwarstwy, a główny łańcuch polimeru lokował się na granicy międzyfazowej pomiędzy lipidem membraną i wodą
- str. 97, „Dlatego też wniosek można wnioskować, że”

Pytania:

- **Proszę o wyjaśnienie niskiego potencjału zeta liposomów modyfikowanych polimerem 1, dlaczego wartość jest tak niska?**
- **„Wpływ polikationów modyfikowanych hydrofobowo na przepuszczalność błony był wcześniej badany. w naszych symulacjach skupiono się zatem na zachowaniu oligomerów, gdy układ ustabilizował się po procesach tworzenia porów”. Proszę tutaj o szerszy komentarz wpływu hydrofobowo modyfikowanych polikationów na uwalnianie czynników aktywnych zamkniętych w liposomach.**

Trzeci rozdział Doktorantka poświęciła badaniom polimerosomów jako fotochemicznych nanoreaktorów. Polimerosomy otrzymywano z amfifilowego kopolimeru blokowego, w którym blok hydrofobowy stanowił polistyren, a hydrofilowy – poli(kwas akrylowy). Doktorantka wykazała możliwość tworzenia polimerosomów z takiego kopolimeru oraz enkapsulacji hydrofobowych czynników aktywnych w ich strukturze. Następnie przeprowadziła badania oraz charakterystykę tworzonych polimerosomów, jako fotoreaktorów. Badania FRET potwierdziły przeniesienie energii pomiędzy barwnikiem zamkniętym w błonie polimerosomu, a barwnikiem znajdującym się na powierzchni pęcherzyka. Doktorantka uzyskała obiecujące wyniki dotyczące tworzenia oraz zastosowania tego typu struktur, jako nośników substancji hydrofobowych oraz jako fotoreaktorów. Moje pytania do tej części:



Uwagi:

- Sformułowanie „zdjęcie TEM” proponowałbym zastąpić wyrażeniem „obraz TEM”
- Również na widmach emisyjnych widać, że wraz ze wzrastającym czasem widmo porfiryny wzrasta, co świadczy o jej dezagregacji.

Pytania:

- **Proszę omówić procedurę pokrywania polimerosomu modyfikowanym PEI. Czy aż tak duży wzrost wielkości (z 125 do 316nm) świadczy o pokryciu liposomu warstwą modyfikowanego PEI, wydaje się, że aż tak duży wzrost wielkości sugeruje tworzenie agregatów. Czy obserwowano te układy za pomocą mikroskopii TEM?**

Ostatni rozdział części doświadczalnej poświęcony został badaniom interakcji między hydrofobowym lekiem przeciwwgrzybicznym itrokonazolem, a matrycą polimerową złożoną z kopolimeru PEG-PLGA. Pani Wilkosz przeprowadziła szereg badań eksperymentalnych jak i symulacji komputerowych dotyczących akumulacji leku w nanostrukturach kopolimerowych utworzonych z kopolimeru PEG-PLGA. Doktorantka wykazała że ITZ akumuluje się tylko na powierzchni tworzonych cząstek, co wyraźnie ogranicza ilość enkapsulowanego leku. Do tej części mam następujące pytania:

Uwagi:

- str. 133, Włączenie niewielkich ilości leku (do 5 % w/w) powoduje wzrost wielkości nanocząstek kopolimeru.
- str. 144, co to jest „cewka polimerowa”
- Wartość  $K_b$  otrzymana dla mTHPP w polimerowych pęcherzykach jest mniejsza z wartościami znalezionymi dla innych niejonów tetraaryloporfiryny. zamykanych w liposomach. Co to jest „niejon” tetraaryloporfiryny?

Pytania:

- **Czemu w tym przypadku lek hydrofobowy nie kumuluje się w warstwie PEG, tak jak to było w przypadku pegylowanych liposomów?**



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni  
im. Jerzego Habera  
Polskiej Akademii Nauk

KNO | Krajowy Naukowy  
Ośrodek Wiodący

- **Czy jest możliwe dobranie takich warunków, aby otrzymać tylko polimerosomy bądź tylko micelle polimerowe?**

Chciałbym jednak podkreślić, że wymienione wyżej uwagi mają wyłącznie charakter dyskusyjny, a drobne usterki i przejęzyczenia są drugorzędne, i nie mają wpływu, i w żadnej mierze nie wpływają na wysoką wartość merytoryczną recenzowanej pracy doktorskiej.

Podsumowując, praca Pani mgr Natalii Wilkosz została zaplanowana i zrealizowana w sposób profesjonalny, a usterki redakcyjne nie mają wpływu na jej wartość naukową. Doktorantka w swojej pracy dokonała analizy obecnego stanu wiedzy, postawiła sobie ambitne cele naukowe, a uzyskane wyniki pozwoliły na ich zrealizowanie. Uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, w związku z czym wnoszę o dopuszczenie Pani Natalii Wilkosz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Krzysztof Szczepanowicz