

**UNIwersytet w Białymstoku**  
**Wydział Biologiczno-Chemiczny**  
**Instytut Chemii**



dr hab. Agnieszka Z. Wilczewska  
15-245 Białystok, ul. Ciołkowskiego 1K, ☎ (85) 738 80 37, fax: 738 80 99, e-mail: agawilcz@uwb.edu.pl

---

Białystok, 06.08.2018 r.

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

Praca doktorska Pani mgr Natalii Wilkosz została wykonana w Zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem pana dr hab. Mariusza Kępczyńskiego. Dorobek badawczy Pani Wilkosz w zakresie przedstawionej pracy stanowią cztery artykuły naukowe, wszystkie opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym i dobrym współczynniku oddziaływania (IF 3,146-3,466). Dodatkowo jedna praca została wysłana do druku. Doktorantka jest również autorką 27 wystąpień konferencyjnych (postery i komunikaty) prezentowanych na konferencjach i seminariach o zasięgu ogólnopolskim i międzynarodowym. Była kierownikiem projektu Etiuda oraz odbyła trzy staże w bardzo dobrych ośrodkach badawczych (w tym dwa staże zagraniczne).

Tematyka pracy dotyczy nowoczesnych systemów dostarczania leków, ich modyfikacji oraz badania interakcji z substancjami charakteryzującymi się aktywnością biologiczną. Wysokospecjalizowane nośniki skupiają obecnie uwagę ze względu na zakres potencjalnych aplikacji. Dotyczy to w szczególności terapii i diagnostyki medycznej. Celem pracy była synteza struktur pęcherzykowych typu liposomów i polimerosomów, zawierających lipidy lub syntetyczne polimery amfifilowe. Kolejnym celem było zbadanie możliwości wykorzystania otrzymanych układów do immobilizowania na powierzchni lub inkorporowania wewnątrz uzyskanych nośników substancji bioaktywnych.

Zagadnienia podjęte w rozprawie doktorskiej mgr Natalii Wilkosz bardzo dobrze wpisują się w nowoczesne trendy badawcze: poszukiwania nośników leków, a w szczególności badania natury i sposobu ich działania.

Dostarczona do recenzji praca obejmuje 167 stron maszynopisu, w tym „Wprowadzenie i cel pracy” (3 strony), „Część teoretyczną” (26 stron), „Część doświadczalną” (89 stron) oraz „Podsumowanie pracy” (2 strony). W skład pracy wchodzi również: „Streszczenie i Abstrakt” (6 stron), „Wykaz skrótów” (4 strony), „Spis rysunków” (6 stron, 66 pozycji), „Spis tabel” (1 strona, 11

---

pozycji). W końcowej części pracy znajduje się spis piśmiennictwa (14 stron, 177 pozycji) oraz „Wykaz dorobku naukowego” Doktorantki (5 stron).

W rozdziale „Wprowadzenie i cel pracy” autorka wskazała na cechy jakimi powinien charakteryzować nowoczesny nośnik substancji aktywnych. Dalej przedstawiony został ogólny cel pracy. Natomiast w kolejnych akapitach w tym rozdziale Doktorantka przedstawiła wyniki swoich badań, co jest raczej domeną podsumowania, a nie wstępu czy celu pracy. W „Części teoretycznej” Autorka podała informacje związane z tematyką badań rozpoczynając od wymienienia systemów dostarczania leków z podziałem na nośniki hydrofobowe: koniugaty lek-nośnik, micelle polimerowe, liposomy, mikrocząstki oraz omówiła wybrane przykłady zastosowania komercyjnie dostępnych nośników. Kolejne dwa rozdziały poświęciła ona omówieniu liposomów oraz polimerosomów, ze szczególnym uwzględnieniem budowy, zastosowania oraz metod ich otrzymywania. Część z omówionych metod Doktorantka stosowała w swojej pracy. W kolejnych krótkich podrozdziałach pani mgr Wilkosz zwięźle omówiła właściwości oraz budowę, wybranych do badań, trzech substancji aktywnych: jednej z porfiryn, piroksikamu oraz itrakonazolu. Ostatnie podrozdziały tej części pracy zostały przeznaczone dla opisu wybranych metod fizykochemicznych stosowanych przez Doktorantkę w pracy. Wśród nich znalazły się: mikroskopia *cryo*-TEM, waga Langmuira i mikroskopia kąta Brewsteda oraz fluorescencyjne rezonansowe przeniesienie energii (FRET).

„Część doświadczalna” podzielona została na 4 podrozdziały. W pierwszym Doktorantka przedstawia wyniki badań związane z oddziaływaniami piroksikamu z konwencjonalnymi liposomami oraz liposomami modyfikowanymi łańcuchami poli(glikolu etylenowego). Przedstawiła 7 różnych form tautomerycznych leku, których obecność jest zależna od polarności rozpuszczalnika, temperatury oraz pH roztworu (dane literaturowe). Do badań wybrała ona formy „obojętne” występujące przy pH=4. Przeprowadziła również symulacje komputerowe lokalizacji piroksikamu w membranach wzbogaconych i niewzbogaconych cholesterolem. Zsyntezowane przez Doktorantkę, liposomy poddała ona badaniom spektroskopowym w celu wyznaczenia stałych przyłączania leku do dwuwarstwy lipidowej różnych układów. Badania dotyczyły również miejsca usytuowania leku w strukturach liposomalnych, co wykonano z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej (dla liposomów GUV). W tej części pracy Doktorantka wykazała się nie tylko doświadczeniem w syntezie struktur pęcherzykowatych, ale również umiejętnościami planowania badań fizykochemicznych oraz interpretacji wyników. Wykazała jak ważna jest budowa nośnika i substancji aktywnej oraz sposób i miejsce wiązania leku w pęcherzykach liposomów.

W drugiej części badań własnych pani mgr Wilkosz zajmowała się wpływem hydrofobowych modyfikacji pochodnych polialliloaminy na zwitterionową membranę lipidową. Do tego celu

zastosowała ona metody eksperymentalne jak i symulacje metodą dynamiki molekularnej. Stwierdziła, że modyfikacje pochodnych polialliloaminy alkilowymi grupami hydrofobowymi pozwoliły na ich interakcje z błonami lipidowymi. Zbadała wpływ długości łańcuchów alkilowych oraz ich ilość na „zdolność penetracji” błony. Do badania stabilności uzyskanych układów Doktorantka wykorzystwała kalceinę. Zbadała stopień i szybkość jej uwalniania z układów liposom-polikation. W tym celu wykorzystwała między innymi czasowe pomiary widm fluorescencji uwalnianej kalceiny. Do badań wybrała polimery kationowe wykonane przez dwie zewnętrzne grupy badawcze. Autorka wprawdzie nie podała pełnej charakterystyki stosowanych polimerów, ani różnic w strukturze polimerów 2a i 2b oraz 3a i 3b, a opis metodyki ich otrzymywania przedstawiła w sposób bardzo uproszczony, ale wyniki tych badań, wykonanych we współpracy, zostały zamieszczone w publikacji. Badania zostały bardzo dobrze, całościowo zaplanowane, a interpretacja ich wyników jest wnikliwa i nie budzi zastrzeżeń. Uwaga ta dotyczy również dalszej części badań własnych.

W części trzeciej pracy doświadczalnej Doktorantka podjęła się syntezy polimerosomów otrzymanych z kopolimerów styrenu i kwasu akrylowego oraz enkapsulacji fotoczułych substancji hydrofobowych np. porfiryny mTHPP w ich strukturze. Doktorantka zwróciła uwagę, że tego typu układy nie nadają się na nanośniki leków, dlatego też celem badań, było poznanie interakcji membrany polimerowej z hydrofobowymi substancjami oraz tworzenie nanoreaktorów fotochemicznych. Do tego ostatniego zadania pani mgr Wilkosz zastosowała układ polimerosom PS-*b*-PAA z perylenem wraz z koniugatem polietylenoiminy z izocyjanianem fluoresceiny. Na podstawie badań fizykochemicznych Doktorantka stwierdziła, że uzyskane struktury są kuliste, monowarstwowe. Taka budowa pozwala na enkapsulację zarówno substancji hydrofobowych (interakcja z membraną) jak i hydrofilowych (wewnątrz pęcherzyków). Natomiast stabilność struktur jest związana z kwasowością środowiska, w którym one są tworzone i stosowane. Układ badano pod kątem możliwości rezonansowego przeniesienia energii (FRET). Doktorantka stwierdziła, że wydajność procesu FRET dla tego nanoreaktora była duża, co ma nadzieję, pozwoli w przyszłości na wykorzystanie tego typu układów jako nowoczesne fotoreaktory.

Czwarta część badań dotyczy samoorganizacji kopolimerów blokowych zawierających poliestry polil(kwasu mlekowego i glikolowego) oraz jego pegylowane pochodne. Doktorantka badała interakcje między itrakonazolem a matrycą polimerową. Pod uwagę wzięła wielkość i rodzaj powstających struktur polimerowych oraz sposób interakcji i samoorganizacji leku w zależności od jego stężenia. Badania dodatkowo wzbogaciła symulacjami metodą dynamiki molekularnej potwierdzając uzyskane w eksperymentach wyniki. Stwierdziła, że itrakonazol

gromadzi się głównie na powierzchni polimerowych membran, co znacznie zmniejsza jego stężenie (załadowanie) na otrzymanych nośnikach.

Zakres wykonanej, przez Doktorantkę, pracy badawczej, tj. przygotowanie różnych układów liposomów i polimerosomów wymagał interdyscyplinarnej wiedzy teoretycznej i umiejętności preparatywnych. Zastosowanie różnych technik, warunków prowadzenia procesów pozwoliły na określenie korelacji z parametrami produktów. Doktorantka wykazała się znajomością różnorodnych technik analitycznych na podstawie których potrafiła opracować wyniki. Do charakterystyki fizykochemicznej układów i badania ich interakcji z substancjami aktywnymi wykorzystwała kriogeniczną transmisyjną mikroskopię elektronową (cryo-TEM), dynamiczne rozproszenie światła (DLS), mikroskopię kąta Brewstera, różnicową kalorymetrię skaningową (DSC), laserową skaningową mikroskopię konfokalną (LSCM) oraz spektroskopię fluorescencyjną. Badania eksperymentalne zostały potwierdzone metodami obliczeniowymi dynamiki molekularnej, co bardzo podnosi wartość merytoryczną pracy.

Wyniki otrzymane przez Doktorantkę świadczą o możliwości stosowania różnorodnych technik syntezy struktur pęcherzykowych. Interpretacja wyników nie budzi zastrzeżeń merytorycznych, mam jednak kilka uwag, które wymagają wyjaśnienia lub komentarza:

1. Dlaczego badania oddziaływań piroksikamu z liposomami prowadzone były przy pH = 4,00? Fizjologiczne pH jest w zakresie 7,35-7,45, a przy takim pH dominującą formą leku jest forma anionowa, która nie była badana.

2. Syntetyczne liposomy (pierwsza część pracy) nie były wzbogacane w cholesterol. Natomiast w symulacjach metodą dynamiki molekularnej były, dlaczego?

3. Nie podano struktury polimerów (składających się z 33 merów), których dotyczą symulacje komputerowe. Proszę o wyjaśnienie.

4. Uwagi do trzeciej części pracy: Na rysunku 44 przedstawiono dwuwarstwę polimerową. Natomiast w wyniku badań strukturalnych stwierdzono, że tworzy się polimerosom monowarstwowy (str. 103). Czy dodatek perylenu powoduje utworzenie dwuwarstwy? Proszę o komentarz.

5. Na rysunku 45 zamieszczono wzory fluoresceiny, a zgodnie z podaną literaturą [155] wyniki badań dotyczą izocyjanianu fluoresceiny. Autorka nie zwróciła również uwagi na formę izocyjanianu fluoresceiny. Na rys. 37 przedstawiono formę cykliczną pochodnej fluoresceiny, na rys. 45 widnieją jedynie formy otwartopierścieniowe. W jakiej formie występowała pochodna fluoresceiny w warunkach prowadzenia badań? Proszę o komentarz.

Pomimo wysokiej wartości merytorycznej pracy Autorce nie udało się uniknąć „skrótów myślowych” i błędów stylistycznych. Kilka przykładów: str. 30 „zdolność tworzenia porów ... była

oceniań za pomocą eksperymentów z uwalniania kalceiny”, str. 75 „polikation zmodyfikowany przez przyłączenie 33% grup heksylowych” i dalej „Rozważano wpływ długości gęstości podstawienia...”; str. 85 „polimerów... były eksponowano do roztwór”; str. 97 „dlatego też wniosek można wnioskować”; str. 124 „roztwory czystych komponentów oraz ułamków molowych nanoszono na wodę”; str. 134 „z powierzchni rozdziału został zaobserwowano przy...”. W pracy znalazły się również błędy edytorskie: str. 24 jest „fotochemiczny” powinno być „fotochemiczne”, str. 75 jest „adsorpcje” powinno być „adsorpcję”, str. 98 jest „systemu” powinno być „systemy”; str. 99, jest „fluoresceina” powinno być „fluoresceiną”; str. 127 jest „Ten” powinno być „Tą”; str. 132 jest „stężeniem” powinno być „stężeniu”. Znalazły się też zadania zaczynające się z małej litery strony: 82, 86, 92, 95, 97, 99, 111, 125 i niepotrzebne spacje w nazwach związków organicznych.

Zgodnie z przyjętą nomenklaturą polimery przypisywane przez Doktorantkę jako „losowe” powinny być nazywane polimerami statystycznymi (str. 14). Nazwy jednoczłonowe polimerów powinny być pisane bez nawiasów: jest „poli(allyloamina)” powinno być poli(allyloamina) (str. 82); natomiast powinno być poli(glikol etylenowy) a nie „glikol polietylenowy” str. 14; str. 82 jest „czwartorzędowe sole aminowe” powinno być „czwartorzędowe sole amoniowe”.

Podsumowując przedstawioną do recenzji pracę doktorską pani mgr Natalii Wilkosz, oceniam wysoko. Spełnia ona kryteria nowości naukowej, co zostało udokumentowane artykułami opublikowanymi w czasopismach o zasięgu międzynarodowym znajdujących się na liście filadelfijskiej. Praca stawowi ważny wkład w rozwój badań nad nanomateriałami lipidowymi i polisomowmi oraz ich oddziaływaniami ze związkami charakteryzującymi się aktywnością biologiczną i fotochemiczną. Zamieszczone uwagi stylistyczne nie mają wpływu na bardzo dobrą ocenę merytoryczną badań przedstawionych w pracy.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca Pani mgr Natalii Wilkosz spełnia wymagania „Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym...” z dnia 18 marca 2011 r i zwracam się do Rady Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Natalii Wilkosz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wartość naukową pracy, na którą miały wpływ umiejętności i zaangażowanie Doktorantki, wnioskuję również do Rady Wydziału o jej wyróżnienie.

*Abstrakcja*