

Prof. dr hab. Krzysztof Szczubiałka
Wydział Chemii UJ
Zakład Chemii Fizycznej
Zespół Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów
Gronostajowa 2
30-387 Kraków
Email: k.szczubialka@uj.edu.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kraków, 11 listopada 2023

Wydział Chemii

Recenzja pracy doktorskiej Pana mgr Aleksandra Forysia pt. „Charakterystyka struktur lipidowo-polimerowych metodami obrazowania krio-TEM i dyfrakcji rentgenowskiej SAXS”

Praca doktorska Pana Aleksandra Forysia dotyczy charakteryzacji struktur powstałych w wyniku oddziaływania dwóch typów związków amfifilowych, tj. lipidów i amfifilowych polimerów blokowych. Częsteczki obu tych typów związków w roztworach wodnych ulegają samoorganizacji tworząc bogactwo różnorodnych struktur koloidalnych. W szczególności lipidy, takie jak będący tematem pracy monooleinian glicerolu (GMO), są zdolne do tworzenia liotropowych ciekłych kryształów (LLC), które w rozdrobnieniu nanometrycznym noszą nazwę liotropowych nanocząstek ciekłokrystalicznych (LLCNP). W strukturze takich nanocząstek występują domeny hydrofobowe, posiadają więc one naturalną zdolność solubilizowania nierozpuszczalnych w wodzie hydrofobowych substancji, w tym leków. Stąd też układy takie budzą szerokie zainteresowanie jako układy dostarczania leków i pod tym kątem były również badane przez Doktoranta. Układy koloidalne ze swojej natury są jednak mniej lub bardziej niestabilne i często w zastosowaniach praktycznych wymagają dodatku stabilizatorów. Rolę stabilizatorów w pracy Pana Forysia pełniło pięć polimerów blokowych, zawierających jeden blok hydrofobowy i jeden lub dwa bloki hydrofilowe. Blokami hydrofobowymi były biodegradowalne polilaktony, takie jak poli(kwas mlekowy) (PLA), poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) i poli(β -butyrolakton) (PBL) oraz poli(5-metylo-5-etyloksykarbonylo-1,3-dioksan-2-on) (PMEC). Wszystkie te bloki zostały otrzymane w reakcji z otwarciem pierścienia. Blokami hydrofilowymi były natomiast poli(tlenek etylenu) i/lub poliglicydol.

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



UNIwersytet
Jagielloński
w Krakowie

Polimery blokowe Doktorant otrzymał dobudowując do bloku hydrofilowego blok hydrofobowy bezpośrednio lub poprzez bezwodnik bursztynowy. Przebieg syntez polimerów Doktorant szczegółowo opisał, w przypadku niektórych procedur odsyłając czytelnika do odpowiednich pozycji literaturowych. Należy tu podkreślić celowe wykorzystanie przez Doktoranta polimerów nietoksycznych, pozwalające na ich wykorzystanie w zastosowaniach biomedycznych. Jako polimerowy stabilizator referencyjny Doktorant zastosował komercyjnie dostępny, powszechnie stosowany amfifilowy polimer trójblokowy poloksamer P407.

Polimery blokowe Doktorant wszechstronnie scharakteryzował typowymi metodami takimi jak chromatografia żelowa, spektroskopia NMR i rozpraszanie światła. Wyznaczył ich podstawowe parametry strukturalne takie jak masa cząsteczkowa, współczynnik dyspersji i stopnie polimeryzacji bloków.

Stabilizowane polimerami liotropowe nanocząstki ciekłokrystaliczne Doktorant otrzymał metodą top-down w warunkach stężenia i temperatury pozwalających, zgodnie z literaturą, na uzyskanie fazy kubicznej. Stabilizując je polimerami Doktorant otrzymał 5 układów GMO/polimer, każdy w dwóch różnych proporcjach lipid/polimer oraz zsyntezował dwa układy referencyjne.

Otrzymane układy scharakteryzował wszechstronnie za pomocą technik stosowanych klasycznie w badaniach nad układami nanometrycznymi, tj. za pomocą dynamicznego rozpraszania światła (DLS), transmisyjnej kriomikroskopii elektronowej (cryo-TEM) i małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (SAXS).

Pomiary techniką DLS pozwoliły Panu Forysiowi oszacować rozmiary powstałych w poszczególnych układach obiektów. W większości przypadków wyniki te były zgodne z otrzymanymi za pomocą transmisyjnej kriomikroskopii elektronowej.

Za pomocą cryo-TEM Doktorant wykazał, że o ile niestabilizowany lipid GMO nie tworzył uporządkowanych struktur, to w układach stabilizowanych otrzymanymi przez Niego polimerami, odpowiednio dobierając polimerowy stabilizator i stosunek lipid/polimer, udało Mu się uzyskać klasyczne kubosomy, jak i nie występujące w klasycznym diagramie fazowym GMO wielowarstwowe koncentryczne struktury oraz struktury cylindryczne. Uważam, że te ciekawe układy warte są dalszych badań ze względu na potencjalnie nowe właściwości i zastosowania.

Cztery układy, w których występują uporządkowane wewnętrznie obiekty, Doktorant zbadał dodatkowo za pomocą techniki małokątowego rozpraszania

Wydział Chemii

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

promieniowania rentgenowskiego (SAXS) przypisując im typy uporządkowania oraz identyfikując układ o największym stopniu uporządkowania.

W aspekcie zastosowań praktycznych badanych układów Doktorant zbadał możliwość ich zastosowania jako układów dostarczania leków. Jako związek modelowy wykorzystał hydrofobowy związek *trans*-resweratrol (RSV), naturalną pochodną stilbenu. Jest to suplement diety posiadający wiele korzystnych efektów, w tym działanie przeciwzapalne i przeciwnowotworowe. Doktorant wykazał, że wybrane przez Niego do badań cztery układy korzystnie charakteryzowały się bardzo wysoką, zbliżoną do 100%, efektywnością enkapsulacji i stopniem załadowania około 10%. Dla tych układów Pan Foryś wyznaczył profile uwalniania resweratrolu stwierdzając duże różnice w ułamku uwolnionego związku, nie przekraczającym jednak około 40%, przy podobnym kształcie krzywych uwalniania. Uwalnianie resweratrolu trwało korzystnie około 6 h, a więc 2-6-krotnie dłużej niż czas półtrwania resweratrolu w osoczu wynoszący 1-3 h dla pojedynczej dawki (doi: 10.1002/mnfr.200800177). Technikami DLS i cryo-TEM Pan Foryś wykazał, że enkapsulacja resweratrolu powoduje zmiany w rozmiarach i morfologii cząstek.

Wydział Chemii

Dorobek publikacyjny Doktoranta

Wyniki badań składających się na pracę doktorską Doktorant opublikował w 3 publikacjach w dobrych czasopismach z listy filadelfijskiej. Jest też współautorem 40 publikacji niezwiązanych bezpośrednio z pracą doktorską, choć generalnie również dotyczących koloidalnych układów polimerowych i surfaktantowych. Wyniki swoich badań prezentował w formie 3 prezentacji ustnych konferencjach krajowych i zagranicznych i 3 posterów.

Ocena pracy doktorskiej

We wstępie teoretycznym Doktorant zawarł wystarczająco szerokie wprowadzenie do tematyki liotropowych nanocząstek ciekłokrystalicznych oraz opis ich otrzymywania. Przedstawił metody pomiarowe stosowane do charakteryzacji badanych nanostruktur i uzasadnił ich zastosowanie w prowadzonych badaniach. Doktorant podał też szeroki przegląd przykładów zastosowań nanocząstek ciekłokrystalicznych do dostarczania leków różnymi drogami i w różnych zastosowaniach, w szczególności charakteryzując nanocząstki reagujące na bodźce takie jak pH, światło i pole magnetyczne.

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

W treści pracy nie dopatrzyłem się poważniejszych błędów metodologicznych, nieścisłości ani błędnie wyciągniętych wniosków. Lektura pracy doktorskiej Pana Forysia pozwoliła mi jednak na sformułowanie następujących uwag, komentarzy i pytań. Podczas obrony prosiłbym Doktoranta o ustosunkowanie się jedynie do uwag merytorycznych.

Uwagi merytoryczne:

1. Pełna charakterystyka każdego z polimerów powinna zawierać stopnie polimeryzacji każdego z bloków. W Tabeli 4 Doktorant zawarł podał stopień polimeryzacji dla bloku hydrofobowego i jego zawartość wagową w polimerze, nie ma tam natomiast podanych stopni polimeryzacji bloków hydrofilowych. Dla bloków PEO o masie 5000 Da jak łatwo obliczyć wynosi on aż 113. Podanie tych liczb pozwoliłoby czytelnikowi łatwiej uświadomić sobie względne długości bloków hydrofobowych i hydrofilowych i fakt, że w większości przypadków blok hydrofilowy jest znacznie dłuższy niż hydrofobowy. Czy Doktorant zauważył związek tego faktu np. ze stopniem uporządkowania układów lub ich zdolnością do stabilizacji badanych układów?
2. Na stronie 70 Doktorant stwierdził: „Ponadto naładowane ujemnie nanocząsteczki nie wchodzą w interakcje z białkami surowicy, co wydłuża okres półtrwania preparatów”. Jednakże cząsteczki białek osocza, mimo że jako całość mogą być naładowane ujemnie, mogą posiadać dodatnio naładowane domeny, które lokalnie mogą oddziaływać z ujemnie naładowanymi cząstkami. Ponadto to właśnie wiązanie substancji przez białka osocza wydłuża okres półtrwania leku w osoczu.
2. Sygnały na chromatogramach PEO-b-PCL i PEO przypuszczalnie zostały błędnie oznaczone (na odwrót).
3. Doktorant w kilku miejscach wymienia skróty GMO i MO jako skróty różnych związków (strony 19, 35, 38, Tabela 1), podczas gdy są to skróty dwóch różnych nazw tego samego związku.
4. Stężenie na wykresie krzywej kalibracyjnej resweratrolu jest przypuszczalnie zawyżone. Absorbancja resweratrolu o stężeniu rzędu mg/mL byłaby dużo wyższa.
5. Badania stabilności dyspersji dawałyby pełniejszy obraz działania stabilizatorów polimerowych, gdyby były uzupełnione o wyniki dla dyspersji niestabilizowanego GMO oraz stabilizowanego referencyjnym polimerem P407.

Pomniejsze uwagi dotyczące języka, stylu i edycji i nomenklatury:

Wydział Chemii

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

W pracy jest dość dużo błędów literowych, słów w niewłaściwych przypadkach i liczbach. Występują też błędnie użyte cytowania, np. w publikacjach 16 i 17 nie znalazłem informacji o hemolitycznym działaniu fitantriolu, które mnie zaciekało (strona 12). Rysunek 2 zawiera błędny wzór fitantriolu. W pracy pojawiały się następujące błędnie użyte terminy: absorpcja zamiast adsorpcja (strona 70), PDI zamiast DI, cząstka/cząsteczka/nanocząsteczka. Sonikacja polega na zastosowaniu ultradźwięków (strona 23). DSC mierzy przekazane ciepło a nie szybkość jego przepływu w funkcji temperatury (strona 32). Resweratrol nie jest zarejestrowanym lekiem, a suplementem (strona 50 i 90).

Wydział Chemii

Pragnę podkreślić, że uwagi powyższe nie wpływają na moją wysoką ocenę merytorycznej wartości pracy. Jej dokładna analiza pozwoliła mi stwierdzić, że Doktorant jest doświadczonym chemikiem, który potrafi przeprowadzić udaną syntezę nowych, bardzo ciekawych materiałów, wszechstronnie je scharakteryzować pod kątem fizykochemicznym, zastosować odpowiednie, wymagające pod względem teoretycznym, techniki badawcze i wyciągnąć uzasadnione wnioski. Jego praca wniosła znaczący wkład w rozwój badań nad relatywnie mało poznanymi, choć ważnymi i ciekawymi układami koloidalnymi, którymi są liotropowe nanocząstki ciekłokrystaliczne.

Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim. **Zwracam się zatem do Rady Naukowej Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrze z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pana mgr Aleksandra Forysia do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Krzysztof Szczubiałka

Krzysztof Szczubiałka

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl