

Łódź, 3 sierpnia 2015 r.

RECENZJA

pracy doktorskiej pana **mgr inż. Mateusza Goseckiego**
p.t. „Nano- i mikrocząstki z polilaktydów, poli(tlenku etylenu) i ich pochodnych jako nośniki
związków biologicznie czynnych”

Ogólna ocena pracy

Praca doktorska pana Mateusza Goseckiego dotyczy poszukiwania nowych materiałów polimerowych do zastosowań w bardzo zaawansowanych dziedzinach farmacji i medycyny, to jest do kontrolowanego dostarczania leków oraz terapii genowej. W tych dwu dziedzinach, mimo wieloletnich badań i niezaprzeczalnego postępu, istnieją problemy dotąd nierozwiązane. W zakresie kontrolowanego uwalniania leków nierozwiązany problem to dostarczanie insuliny drogą doustną lub wziewną, natomiast w dziedzinie terapii genowej stworzenie skutecznych niewirusowych nośników DNA. W omawianej pracy Autor postanowił zmierzyć się z tymi właśnie dwoma poważnymi i jakże istotnymi problemami współczesnej terapii. Jest to zamierzenie niezwykle ambitne. Oczywiście, przykładając do tego zamierzenia realistyczną miarę, Autor nie mógł podjąć się przedstawienia kompletnego rozwiązania obu problemów. Podjął się jednak dokonania w każdej z tych dziedzin pewnego postępu. Mianowicie, zaplanował opracowanie, zsyntetyzowanie i przetestowanie nowego układu micelarnego do enkapsulacji i uwalniania insuliny, a w drugiej z badanych dziedzin zsyntetyzował i przetestował nowe polimery kationowe, które nie były dotychczas badane jako potencjalne nośniki DNA w terapii genowej.

Tak nakreślone, bardzo ambitne cele pracy udało się Autorowi w pełni zrealizować. Opracował metody i skutecznie przeprowadził trudne syntezy odpowiednich polimerów, o złożonej budowie, przy czym parametry tych makrocząsteczek w pełni odpowiadały cechom założonym na etapie planowania syntez. Otrzymane produkty poddał wielostronnej analizie chemicznej i fizykochemicznej, nie ograniczając się do potwierdzenia struktury produktów, ale również zmierzając do określenia ich cech fizykochemicznych w roztworach, między innymi zdolności do tworzenia micel i właściwości tychże micel, a także korelacji między pH roztworu a właściwościami wytworzonych polikationów. W kolejnym etapie Autor wykazał, że wytworzone polimery nadają się – na razie in vitro – do założonych celów, to jest w pierwszym przypadku do skutecznej i wydajnej enkapsulacji insuliny i jej kontrolowanego uwalniania, a w drugim przypadku do skutecznego wiązania fragmentów DNA poprzez tworzenie polipleksów. Autor nie poprzestał jednak na badaniach in vitro. Ostatnia część pracy to badania biologiczne dotyczące poliamin mających potencjalnie znaleźć zastosowanie w terapii genowej. Badania biologiczne składały się z wielu elementów. Wykonano testy cytotoksyczności otrzymanych polimerów w stosunku do kilku

linii komórkowych. Zbadano efektywność transfekcji genu kodującego wytwarzanie białka wykazującego zieloną fluorescencję przy użyciu badanych polimerów i wreszcie wykonano badania dotyczące zdolności polipleksów do przenikania do wnętrza komórki. Fakt, że nie wszystkie badania biologiczne doprowadziły do pozytywnych wyników, w niczym nie umniejsza znaczenia tej części pracy. Uzyskane wyniki, zarówno te pozytywne jak i negatywne, są cennym zbiorem wiarygodnych informacji, na podstawie których w przyszłości takie układy będą mogły być optymalizowane. Wartość naukową tej pracy oceniam bardzo wysoko. Jest to pionierska, bardzo obszerna praca o wybitnie interdyscyplinarnym charakterze. **Autor wykazał się bogatą wiedzą, inwencją i wyobraźnią w planowaniu swoich prac, biegłością w pracy laboratoryjnej, znajomością bardzo szerokiej palety technik badawczych, a także umiejętnością wnikliwej, dojrzałej i wyważonej interpretacji uzyskanych wyników. Nie mam wątpliwości, że Autor pracy w pełni zasługuje na nadanie mu stopnia doktora.**

Biorąc pod uwagę fakt, że praca jest tak obszerna i zawiera wiele cennych wyników stanowiących nowość naukową, szkoda, że aktywność publikacyjna Autora pracy była niezbyt wysoka - Autor ma w swoim dorobku jedną pracę, opublikowaną cztery lata temu.

Uwagi szczegółowe

Pracę rozpoczyna obszerne, logicznie zaplanowane i bardzo dobrze napisane wprowadzenie literaturowe, oparte na najnowszym stanie wiedzy w zakresie mikro- i nanocząstek jako układów do kontrolowanego dostarczania leków, a także do terapii genowej. Uważam, że ten rozdział pracy bez większych zmian mógłby być opublikowany jako samodzielny artykuł przeglądowy w dobrym czasopiśmie.

Moje drobne uwagi krytyczne do tej części pracy są następujące

- Pośród wymienianych przez Autora metod otrzymywania nano- i mikrocząstek polimerowych zabrakło międzycząsteczkowego i wewnątrzcząsteczkowego sieciowania polimerów (w układach nie zawierających monomerów). Z kolei w wykazie typowych polimerów używanych do wytwarzania nośników substancji biologicznie aktywnych zabrakło poli(*N*-winylopirolidonu), szeroko stosowanego w przemyśle farmaceutycznym jako nośnika substancji aktywnych zarówno w klasycznych postaciach leku (np. w tabletkach), jak i w formach bardziej zaawansowanych (np. makro- i mikroskopowe hydrożele).
- W opisie rysunku 4 i równań (2) i (3) na str. 18 nie wyjaśniono dokładnie co oznaczają i czym różnią się od siebie promienie R_1 i R_2 .
- Stwierdzenie, że aby polimer mógł być usunięty z organizmu musi być rozpuszczalny w wodzie lub degradowany do produktów rozpuszczalnych w wodzie (str. 20), jest nieprecyzyjne. Rozpuszczalność polimeru w wodzie nie gwarantuje tego, że jest on łatwo usuwany z organizmu. Dla większości syntetycznych, nie ulegających biodegradacji

polimerów rozpuszczalnych w wodzie istnieje górna granica ciężaru cząsteczkowego (zwykle nie więcej niż kilkanaście kDa), powyżej której polimer zasadniczo nie może być usunięty z organizmu przez nerki, co często prowadzi do jego akumulacji w wątrobie. Powstaje pytanie, jaka jest maksymalna długość łańcuchów poliglicydolu, które mogą być usuwane z organizmu przez nerki.

- Podpis do rys. 11 jest sformułowany nieco niezręcznie. Wynika z niego, że kwas akrylowy jest pochodną kwasu akrylowego.
- Trudno zgodzić się ze stwierdzeniem (str. 33), że „obszar działania ultradźwięków jest ograniczony do małej objętości, przez co ich wykorzystanie ogranicza się w zasadzie do skali laboratoryjnej”. Po pierwsze, to, jaki jest obszar działania ultradźwięków, zależy od konstrukcji reaktora i ten obszar w nowoczesnych reaktorach ultradźwiękowych nie musi być mały. Po drugie, są produkowane przemysłowe reaktory ultradźwiękowe i są one z powodzeniem stosowane do wytwarzania nanocząstek.
- Nie jest jasne, co Autor rozumie przez nukleację cząsteczek polimeru (str. 34).
- W opisie metod wytwarzania mikro- i nanocząstek nie znalazłem prostej metody dość często stosowanej w laboratoriach polegającej na wkraplaniu kropeł roztworu polimeru do rozpuszczalnika zawierającego reagent powodujący wytrącenie polimeru (klasyczny przykład to wkraplanie alginianu do roztworu soli wapnia – produkowane są nawet komercyjnie urządzenia do tego celu). Jest to metoda różna od nanowytrącania, przynajmniej w postaci zdefiniowanej przez Autora pracy jako wkraplanie do nierozpuszczalnika.
- Na str. 42 podano wartości współczynnika dyspersji, nie dowiadujemy się jednak, jak ten współczynnik jest zdefiniowany. Jest to o tyle istotne, że wartości współczynnika dyspersji pojawiają się również w części wynikowej pracy (m.in. na str. 87), gdzie są zdefiniowane jako stosunek objętościowo średniej do liczbowo średniej średnicy cząstek. Jest jednak mało prawdopodobne, by wartość tak zdefiniowanego współczynnika mogła przyjmować wartości znacznie mniejsze od jedności, na przykład 0,02, jak to podano na str. 42. Mam wrażenie, że Autor przez określenie współczynnika dyspersji rozumie zatem dwie różne wielkości fizyczne, i szkoda, że nie zostało to w pracy wyjaśnione.
- W świetle obecnego stanu rozwoju mikroskopii fluorescencyjnej, w tym także odkryć dokonanych przez laureatów nagrody Nobla z chemii z roku 2014, trudno zgodzić się z opinią Autora (str. 43), że mikroskopia optyczna jest niezbyt przydatna do obserwacji cząstek stosowanych jako nośniki substancji biologicznie czynnych. Wręcz przeciwnie, śledząc literaturę przedmiotu można odnieść wrażenie, że mikroskopia fluorescencyjna, będąca przecież odmianą mikroskopii optycznej, jest obecnie podstawową metodą obserwacji takich obiektów i ich oddziaływań z układami biologicznymi. Opinia ta jest tym



bardziej niezrozumiała, że Autor sam używa mikroskopii optycznej do badania wnikania polielektrolitów z DNA do wnętrza komórek.

- Podany na str. 45 opis zjawisk zachodzących w roztworze polimeru poddanym działaniu wiązki światła laserowego, będących podstawą metody dynamicznego rozpraszania światła, jest o tyle nieprecyzyjny, że może sugerować, jakoby efekt Dopplera był powodem fluktuacji natężenia światła rozproszonego. Efekt Dopplera istotnie towarzyszy badanym tu zjawiskom, ale nie jest przyczyną mierzonych fluktuacji.
- Opisując równanie (6) Autor miał zapewne na myśli funkcję eksponencjalną, czyli wykładniczą o podstawie równej e. Z kolei na str. 47 prawdopodobnie chodziło o metodę stalagmometryczną.
- Ogólnie nie jest prawdą, że wartość iloczynu $Kc/R(\theta)$ jest odwrotnie proporcjonalna do ciężaru cząsteczkowego obiektów rozpraszających światło (str. 48). Takie stwierdzenie byłoby prawdziwe jedynie dla wartości tego iloczynu w podwójnej granicy: dla c i θ dążących do zera (a te warunki z oczywistych względów nie są spełnione przy prowadzeniu pomiarów opisanych w tym fragmencie pracy). Rzecz jasna, nie podważa to stosowalności metody statycznego Rayleighowskiego rozpraszania światła do wyznaczania wartości CMC.
- Czy oznaczenia sekwencji merów użyte w dyskusji widma przedstawionego na rys. 50 istotnie odpowiadają heksadom ?
- Na str. 50 Autor omawia szczegółowo w tekście dość złożone widma emisyjne pirenenu i 1-fenyl-1,3-butanodionu, a także ich zależność od polarności otoczenia. Szkoda, że nie pokazano w tym miejscu rysunków przedstawiających te widma – czytelnikowi bardzo by to ułatwiło zrozumienie tego fragmentu tekstu.
- Znaczną część badań własnych opisanych w tej pracy stanowią syntezy kopolimerów blokowych poliglicydolu i laktydu oraz polieterów z grupami aminowymi. Objętościowo opis ten stanowi ponad 40 % części wynikowej. Autor sam podkreśla (str. 69), że opracowanie sposobów syntezy to jeden z najważniejszych celów pracy. Szkoda, że zagadnienia leżące u podstaw tychże syntez nie są opisane w części literaturowej, a zatem czytelnikowi trudno się zorientować, jaki był stan wiedzy w dziedzinie otrzymywania kopolimerów blokowych poliglicydolu i laktydu oraz polieterów z grupami aminowymi, i jakie istotne problemy należało pokonać planując i wykonując takie syntezy. Bez opisu stanu wiedzy w tej dziedzinie trudno ocenić, na ile zaproponowane i przeprowadzone przez Autora syntezy są oryginalnymi osiągnięciami i mają walor nowości naukowej. Wprawdzie w części wynikowej, przed opisami syntez, są zamieszczone krótkie wstępy (str. 77 i str. 103-104), ale również z nich trudno się zorientować co do oryginalności zastosowanego podejścia. Na przykład na str. 77 podano lakoniczną informację, że syntezę kopolimerów blokowych poliglicydolu i laktydu wykonano „w sposób podobny do



opracowanych wcześniej w naszym zespole syntez kopolimerów blokowych polieterowo-poliestrowych”, ale to niewiele wyjaśnia, a zwłaszcza nie wskazuje, na czym polega nowość zastosowanego podejścia syntetycznego. Jasna deklaracja w tej sprawie, choć dotycząca jedynie polieterów z grupami aminowymi, pada dopiero w Podsumowaniu, gdzie czytamy że metodyka syntezy była użyta po raz pierwszy. Sądzę, że taka deklaracja powinna pojawić się wcześniej.

Cele pracy są precyzyjnie i klarownie zdefiniowane w rozdziale 6.

Mam następującą uwagę do rozdziału 7 zatytułowanego „Materiały i metody”. Procedury syntetyczne są opisane bardzo starannie i szczegółowo. Nie ma wątpliwości, że na podstawie tych opisów inny wprawny chemik mógłby te syntezy odtworzyć. Jest natomiast nieco zaskakujące, że w pracy nie opisano zastosowanych metod pomiarowych. Wprawdzie na str. 74 znajdujemy bardzo krótki podrozdział zatytułowany wprost „Metody pomiarowe”, tyle że opisów metod pomiarowych tam nie ma, a jest jedynie wyliczenie typów i nazw użytych przyrządów. Oczywiście nie chodzi mi o to, by Autor w pracy doktorskiej pisał, na przykład, na czym polega spektroskopia w podczerwieni. Powinien jednak opisać szczegółowo zastosowaną przez siebie procedurę pomiarową, sposób przygotowania próbek, warunki pomiarów, ustawienia przyrządu, procedury opracowania wyników. Po pierwsze, od tego może zależeć poprawność uzyskanych wyników i sposób ich interpretacji, po drugie, jest powszechnie przyjętą regułą w doświadczalnych pracach naukowych, że opis powinien być na tyle precyzyjny, by inny specjalista mógł te pomiary powtórzyć. Szkoda zatem, że tych opisów zabrakło.

I kilka uwag do rozdziałów zawierających opis prac własnych Autora.

- Na podkreślenie zasługuje fakt, że Autor w sposób dojrzały i krytyczny ocenia uzyskane wyniki, a także poddaje szczegółowej dyskusji zwłaszcza te wyniki, które uznaje za mniej pewne, oraz takie, w których wystąpiły rozbieżności między wielkościami oznaczonymi przy użyciu różnych technik.
- Doświadczenia związane z otrzymywaniem kopolimerów blokowych poliglicydotu i laktydu oraz polieterów z grupami aminowymi zakończyły się sukcesem. W oparciu o obszerne, uzyskane wieloma zaawansowanymi metodami i przekonujące dane dotyczące analizy produktów Autor udowodnił, że stosując zaprojektowane przez niego procedury syntezy można z dobrą wydajnością otrzymać oczekiwane produkty, a ich struktura z dużą dokładnością odpowiada strukturze planowanej. Biorąc pod uwagę złożoność tych syntez, a także stopień ich technicznego skomplikowania, Autorowi należy się uznanie – niewątpliwie udowodnił, że potrafi skutecznie planować syntezy złożonych struktur polimerowych i jest bardzo sprawnym eksperymentatorem. Jedynym problemem, który nie został rozwiązany, jest stosunkowo szeroki rozkład ciężarów cząsteczkowych produktów – ale tu Autor przedstawił przekonujące wyjaśnienie tego stanu rzeczy (str. 84).

- Szkoda, że przedstawiając w tabelach lub na wykresach wyniki ilościowe pomiarów fizykochemicznych, Autor nie przedstawił żadnej analizy statystycznej tych wyników, choćby w najskromniejszym zakresie, czyli przez podanie odchylenia standardowego lub słupków błędów. Nie wiemy też, czy podane wartości są uśrednione z wielu pomiarów (a jeśli tak, to z ilu), czy są to wyniki pojedynczych pomiarów. Jest to istotne zagadnienie, przede wszystkim dla oceny precyzji, a pośrednio i wiarygodności prezentowanych wyników.
- Moim zdaniem, rys. 43 nie jest optymalną ilustracją poszerzenia rozkładu ciężarów cząsteczkowych na kolejnych etapach syntezy. Szkoda, że Autor nie przestawił na tym rysunku samych rozkładów ciężarów cząsteczkowych, zamiast chromatogramów. Ponieważ masy cząsteczkowe nie skalują się liniowo z objętością retencji, zatem, ściśle rzecz biorąc, trudno z graficznego porównania chromatogramów wnioskować o zmianach szerokości rozkładu ciężarów cząsteczkowych, zwłaszcza jeśli maksima dla porównywanych chromatogramów są względem siebie przesunięte.
- Nie w pełni zrozumiała jest dla mnie procedura opisana w rozdziale 8.2. Dlaczego, by otrzymać micelle z uprzednio zsyntetyzowanego kopolimeru blokowego, niezbędne jest zastosowanie dializy? Czy można otrzymać micelle z tych kopolimerów poprzez rozpuszczenie ich w wodzie w stężeniu wyższym od CMC, tak jak to ma miejsce w przypadku wielu typowych kopolimerów blokowych tworzących micelle, np. Pluroniców? Zapewne zastosowana przez Autora procedura dializy jest niezbędna do enkapsulacji insuliny (rozdział 8.3), ale czy jest niezbędna do otrzymania samych micel? W tym samym rozdziale nie jest też jasne, co Autor określa mianem cząstek – czy ma na myśli micelle, czy jakieś inne struktury. Przykładowo w legendzie do Tabeli 4 używane są oba określenia, i nie wiadomo czy w tym samym znaczeniu. Wątpliwości czytelnika w tym względzie wzmagają zamieszczona na str. 13 definicja cząstek jako stałej matrycy, a trudno micelle traktować jako substancję stałą.
- Czy wymiary micel opisywanych w rozdziale 8.2 zależą od stężenia kopolimerów? Jeśli tak, to jakiemu stężeniu odpowiadają dane z Tabeli 4 i rysunku 47? Jak zmieniają się te wielkości wraz ze stężeniem?
- Jak Autor definiuje i jak wylicza zawartość insuliny w micelach?
- Zgadza się z Autorem, że badania uwalniania substancji czynnej z nośników dostarczają podstawowych informacji na temat mechanizmu uwalniania. Dość powszechnie stosowaną metodą badania mechanizmów uwalniania są pomiary kinetyczne. Charakter zależności czasowych uwalniania może być istotną wskazówką co do mechanizmu tego procesu. Niestety, mam wrażenie, że Autor zatrzymał się tu w połowie drogi, nie próbując opisać uzyskanych danych różnymi modelami kinetycznymi. Nie pokazano żadnego dowodu na to, że istotnie dane są najlepiej opisane równaniem pierwszego rzędu. Nie wyznaczono żadnych parametrów kinetycznych. Nie przeprowadzono dyskusji na jaki mechanizm uwalniania wskazują uzyskane dane kinetyczne. Nie sposób nie zadać pytania, w jakim



celu wykonano te czasochłonne i żmudne doświadczenia, skoro nie przeprowadzono gruntownej analizy wyników.

- Poprawnym oznaczeniem jednostki ciśnienia – milibara – jest „mbar” a nie „mBar” (str. 73). Ponadto, szkoda że Autor podając wartości ciśnień nie trzyma się konsekwentnie tych samych jednostek (por. str. 44, gdzie ciśnienie podane jest w torach).
- We wprowadzeniu literaturowym Autor dał dowód dobrej znajomości techniki dynamicznego rozpraszania światła i zrozumienia pewnych pułapek interpretacyjnych typowych dla tej techniki. Analizując własne wyniki uzyskane tą techniką Autor czyni to krytycznie i ostrożnie, wskazując np. na str. 90, że zastosowany algorytm być może nie daje poprawnego obrazu sytuacji. Prawdopodobnie Autor ma rację, ponieważ w technice DLS wybór algorytmu dopasowującego rozkład do krzywej autokorelacji praktycznie biorąc wymaga, by eksperymentator znał z góry charakter tego rozkładu. Jest to jedna z podstawowych wad tej skądinąd wartościowej metody pomiarowej. Szkoda jednak, że Autor, mając tego świadomość, nie poszedł o krok dalej, bo przypuszczając, że charakter rozkładu jest bimodalny, mógł wybrać do prowadzenia analizy taki algorytm, który jest do takiego rozkładu dopasowany.
- Wydaje mi się, że do prowadzenia dyskusji o symetrycznym bądź asymetrycznym charakterze rozkładu wielkości micel nie bardzo nadaje się sposób przedstawiania danych, jaki wybrano dla rys. 49. Aby na podstawie wykresu można było łatwo wnioskować o symetrii lub asymetrii rozkładu, skala X powinna być liniowa, nie zaś logarytmiczna.
- Na końcu rozdziału 8 zabrakło krótkiego podsumowania – który z przebadanych układów Autor uznaje za najlepszy ? Co można by jeszcze zrobić, by zoptymalizować jego właściwości ?
- Na str. 120 Autor wspomina, że kopolimerów zawierających grupy aminowe nie udało mu się zanalizować metodą GPC przy zastosowaniu jako rozpuszczalników chlorku metylenu i DMF. Czy Autor próbował przeprowadzić takie pomiary z użyciem wody lub wodnego roztworu kwasu i soli ? Niektóre polielektrolity kationowe, m.in. wspomniany w pracy chitozan, można analizować metodą GPC właśnie w roztworach wodnych.
- W rozdziale 9.1.2.1 Autor badał kinetykę polimeryzacji EPDEA w THF i przedstawił uzyskane wyniki na rys. 74. Nie wiadomo jednak, z czego wynika przyjęty układ współrzędnych. Nie podano bowiem, jakiego modelu kinetycznego (i dlaczego) użyto do opisu kinetyki, ani też która z reakcji elementarnych decyduje o szybkości procesu. Notabene widać, że wybrany model niezbyt dobrze opisuje przebieg reakcji, ponieważ punkty nie układają się wzdłuż prostej w wybranym układzie współrzędnych. Szkoda, że Autor pozostawił te wyniki bez głębszego omówienia.
- Mam poważne wątpliwości co do poprawności zastosowanego przez Autora w rozdziale 9.2.1 (str. 129) sposobu określania stopnia protonowania grup aminowych w badanych



kopolimerach (chodzi o wyniki podane w tekście na str. 129 i na str. 131). Użyte przez Autora zależności, oparte na klasycznym równaniu Hendersona-Hasselbalcha, poprawnie opisują dysocjację i protonowanie dla związków małowymiarowych. Procesy dysocjacji i protonowania w polielektrolitach różnią się jednak dość znacznie od analogicznych procesów dla związków małowymiarowych, co wynika przede wszystkim ze wzajemnych oddziaływań między sąsiadującymi grupami jonogennymi. Dlatego do opisu dysocjacji i protonowania grup jonogennych w polielektrolitach stosuje się zmodyfikowane równanie Hendersona-Hasselbalcha, którego omówienie można znaleźć w monografiach dotyczących tej klasy polimerów. Nawet gdy wyznaczymy doświadczalnie prawidłowe wartości pK_a lub pK_b dla danego polielektrolitu, zastosowanie klasycznego w miejsce zmodyfikowanego równania może prowadzić do istotnych błędów ilościowych w ocenie stopnia dysocjacji lub protonowania.

- O ile co do swojej istoty sposób przeprowadzenia doświadczenia, którego wyniki ilustruje rys. 82, jest poprawny, wątpliwości budzi prezentowanie wyników, dla których wartość absorbancji przekracza 2. Dla większości prostych spektrofotometrów jest to górna granica zakresu pomiarowego, a zatem prezentowanie wyników, dla których absorbancja jest równa 4 lub nawet 6 (ostatni punkt na pokazanym wykresie) nie ma sensu – przyrząd nie pokazuje wówczas prawdziwych wartości absorbancji. Typowym objawem pracy przy wartościach absorbancji znacznie przekraczających zakres pomiarowy przyrządu jest bardzo silne zaszumienie wyników, i to faktycznie na rys. 82 widzimy. Oczywiście nie podważa to poprawności idei tego doświadczenia ani jego zasadniczego wyniku wskazującego na wytrącanie PEPDEA1 dla pH powyżej 9.
- Opis procedury testu cytotoxycywności nie jest w pełni precyzyjny. Co Autor rozumie przez próbę kontrolną, substancję kontrolną, polimer odniesienia i odnośnik? Które z nich pełnią rolę kontroli pozytywnej, a które kontroli negatywnej? Czy należy rozumieć, że poziom 100 % przeżywalności odpowiada próbie kontrolnej? Dlaczego nie pokazano wyników z substancją kontrolną?
- Szkoda, że na końcu rozdziału 9.3.1 zabrakło choćby krótkiego komentarza do otrzymanych wyników. Czy wyniki te oznaczają, że cytotoxycywność badanych związków jest na tyle mała, by można było rozpatrywać ich zastosowanie *in vivo* jako nośników fragmentów DNA?
- W jakim środowisku przeprowadzono doświadczenia opisane w rozdziale 9.3.2.2 – czy była to woda, czy bufor? Okoliczność ta może mieć wpływ na oddziaływania między plazmidem, bromkiem etyldyny i badanymi polielektrolitami.
- Wyniki pokazane na rys. 102 wymagają pewnych wyjaśnień. Autor podał, przez jaki filtr obserwował fluorescencję, nie wiadomo jednak, czy maksimum przepuszczalności tego filtra odpowiada maksimum emisji zastosowanego próbnika. Jakiego obrazu mikroskopowego powinniśmy się spodziewać w przypadku skutecznego transferu polipleksów do

wnętrza komórki ? Czy drobne czerwone punkty obserwowane na zdjęciach D, E i F oznaczają, że choćby część polipeksów wniknęła do komórek ? Co jest podstawą stwierdzenia, że na zdjęciach C wiele komórek jest martwych ? Dlaczego te komórki wykazują tak intensywną fluorescencję ? Czy zdjęcie B w pełnym spektrum było wykonywane w takich samych warunkach jak pozostałe (tło i komórki wyglądają tu inaczej niż na pozostałych zdjęciach) ?

Podsumowanie pracy jest bez zarzutu – logiczne, krótkie, ale wyczerpujące.

Nieco słabszym aspektem pracy jest jej strona językowa.

- W pracy zdecydowanie kuleje interpunkcja. Najczęstszą usterką tego rodzaju jest brak przecinka na zakończenie zwrotu wtrąconego. O tym, że nie jest to sprawa błaha, świadczą przypadki, w których błędy interpunkcyjne całkowicie zmieniają sens zdania (por. np. zdanie rozpoczynające się od „*Micele zostały wytworzone ...*” na str. 57).
- Autor nie ustrzegł się też błędów językowych. Przykładowo na str. 49 czytamy „*Obserwując zmiany przewodnictwa (...), punkty pomiarowe układają się w dwie proste*”. Wielokrotnie pewne czynności są opisane jako mające miejsce „*w przeciagu*” jakiegoś czasu (np. na str. 14). Na str. 11 czytamy, że pewne układy były badane „*na możliwość ich zastosowania*”. Wielokrotnie powtarzającą się usterką (m.in. na str. 12, 32, 56 i 61) jest używanie rzeczownika w bierniku zamiast w dopełniaczu w zdaniach takich jak: „*Wśród opisywanych w literaturze metod wytwarzania polimerowych cząstek w celu wykorzystania ich jako nośniki substancji biologicznie czynnych ...*”. Poprawną formą byłoby „*w celu wykorzystania ich jako nośników*”.
- Często w pracy pojawia się określenie „*jednostka powtarzalna*” polimeru. Czy chodzi po prostu o mer ?
- Nie znalazłem w aktualnym słowniku języka polskiego PWN często używanego w pracy słowa „*formulacja*”; nie ma go również w przejrzanych przeze mnie słownikach fachowych (m.in. w słowniku terminów medycznych ani w dużym słowniku technicznym WNT). W tekście pracy nie ma też wyjaśnienia co Autor przez to słowo rozumie. Wydaje mi się, że jest to nieuprawniona kalka językowa z języka angielskiego.
- W tekście pracy znajdujemy też stosunkowo liczne błędy literowe.

O ile zasadniczy tekst pracy jest napisany dość starannie, dołączone streszczenia, polskie i angielskie, nieco psują to wrażenie. Te fragmenty pracy sprawiają wrażenie pisanych w pośpiechu i nie poddanych starannej korekcie. Znajdujemy tu, zarówno w tekście polskim jak i w angielskim, błędy językowe, niezbyt klarowne lub wręcz niezrozumiałe sformułowania (np. pierwsze zdanie ostatniego akapitu w wersji angielskiej), a także niewyjaśnione skróty (np. PGL_PLL1), co nie powinno mieć miejsca w streszczeniu jako w tekście, który może być czytany niezależnie od całości pracy.

Również spis literatury został przygotowany niezbyt starannie. Znajdujemy tu kilkadziesiąt błędów (przy jednokrotnej lekturze tej części pracy naliczyłem ich ponad 70); są to głównie, choć nie jedynie, błędy w nazwiskach autorów cytowanych prac (m.in. w pozycjach 32, 33, 35, 65, 80, 105, 119, 157, 158, 176, 183, 192, 204, 282, 297). Ponadto format cytowań jest niekonsekwentny – m.in. niektóre nazwy czasopism podawane są w pełnej formie, a inne w formie skrótów; niekiedy zresztą nazwa tego samego czasopisma jest podawana w różnych formach (np. trzy formy nazwy *Journal of Controlled Release*, m.in. w pozycjach 3, 72 i 96). Niektóre skróty nazw czasopism są niepoprawne.

Szkoda, że Autorowi zabrakło czasu na staranne opracowanie tych części pracy.

Chciałbym stanowczo podkreślić, że **przedstawione powyżej uwagi są raczej dyskusją niż krytyką, a zauważone drobne usterki mają charakter drugorzędny i w żadnej mierze nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę tej ciekawej i bardzo wartościowej pracy doktorskiej.**

Podsumowanie recenzji

Jak wykazałem powyżej, praca doktorska pana mgr inż. Mateusza Goseckiego dotyczy zagadnień bardzo istotnych z punktu widzenia poznawczego i praktycznego, a założone bardzo ambitne cele badawcze zostały w pełni zrealizowane. Praca stanowi obszerny, wielowątkowy i wielostronny, poważny wkład do stanu wiedzy na temat nowoczesnych materiałów polimerowych, które mogą być wykorzystywane do kontrolowanego uwalniania leków i do terapii genowej. Praca zawiera istotne elementy nowości naukowej, jej elementy zostały zawarte w publikacji w liczącym się czasopiśmie międzynarodowym (*Current Pharmaceutical Biotechnology*, IF = 1,95), a także były prezentowane na wielu prestiżowych międzynarodowych konferencjach. Pan mgr inż. Mateusz Gosecki wykazał, że dysponuje szeroką wiedzą, posiada umiejętność planowania, prowadzenia i interpretacji wyników badań naukowych o wysokim stopniu złożoności, krytycznej oceny uzyskanych rezultatów, prowadzenia dyskusji naukowej i formułowania wniosków.

Stwierdzam, że **przedstawiona praca spełnia wszystkie formalne i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN o dopuszczenie pana mgr inż. Mateusza Goseckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Dr hab. inż. Piotr Ulański, prof. PŁ