



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Dr hab. Szczepan Zapotoczny, prof. UJ  
Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii  
Email: [zapotocz@chemia.uj.edu.pl](mailto:zapotocz@chemia.uj.edu.pl)  
Tel. 12 6632254

## RECENZJA

**Rozprawy doktorskiej mgr inż. Mateusza Goseckiego  
pt.: "Nano- i mikrocząstki z polilaktydów, poli(tlenku etylenu) i ich  
pochodnych jako nośniki związków biologicznie czynnych"**

Wydział Chemii

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr inż. Mateusza Goseckiego jest spójna tematycznie i obejmuje zagadnienia związane z otrzymywaniem i charakterystyką homopolimerów i kopolimerów blokowych składających się z polieterów i polilaktydów oraz tworzonych z nich układów typu nano- i mikrocząstek służących do przenoszenia związków biologicznie czynnych. Zaproponowana tematyka, rozwijana w zespole profesora Stanisława Słomkowskiego, jest bardzo aktualna, istotna w zakresie badań podstawowych dotyczących polimeryzacji anionowej, metod wytwarzania i badania cząstek polimerowych, ale także o dużym potencjale aplikacyjnym, głównie w kierunku efektywnego dostarczania leków białkowych oraz transfekcji genów.

Przedstawiona do recenzji rozprawa składa się z dziewięciu zasadniczych rozdziałów (w tym cel pracy) zakończonych podsumowaniem oraz obszerną, obejmującą prawie 300 pozycji, bibliografią. Całość poprzedzona jest zestawieniem skrótów i symboli stosowanych w pracy oraz wstępem. Doktorant nakreśla we wstępie szersze motywacje skłaniające go do podjęcia opisywanych badań, które dotyczą głównie nierozwiązanego ciągle zagadnienia wygodnego i kontrolowanego dostarczania do organizmu leków białkowych takich jak insulina oraz efektywnego przenoszenia kwasów nukleinowych niezbędnego w rozwijanych terapiach genowych.

ul. Ingardena 3  
PL 30-060 Kraków  
tel. +48(12) 633 63 77  
fax +48(12) 634 05 15  
[sekretar@chemia.uj.edu.pl](mailto:sekretar@chemia.uj.edu.pl)  
[www.chemia.uj.edu.pl](http://www.chemia.uj.edu.pl)

Kolejne pięć rozdziałów obejmuje część literaturową pracy, w której doktorant opisuje zagadnienia dotyczące: cząstek polimerowych, polimerów i metod stosowanych do ich wytwarzania oraz metod charakterystyki cząstek i procesów enkapsulacji i uwalniania substancji aktywnych z takich cząstek. Ta część pracy napisana jest z dużą znajomością tematu, w sposób przejrzysty i systematyczny, z obszernym cytowaniem literatury. Świadczy to o zgłębieniu przez doktoranta tematyki rozprawy doktorskiej, a czytelnikowi daje bardzo dobre wprowadzenie do opisywanych dalej zagadnień. Brakuje mi tylko w tej części bardziej szczegółowego opisu stosowanej przez doktoranta polimeryzacji anionowej, która jednakowoż została w pewnym zakresie opisana w części eksperymentalnej.

W dalszej części rozprawy doktorant przedstawia bardziej szczegółowe cele swojej pracy. Cele te zostały jasno sprecyzowane i obejmują: (1) opracowanie sposobu syntezy kopolimerów blokowych z glicydolu i laktydu, (2) zbadanie wpływu długości fragmentu poli(glicydylowego) na właściwości micel utworzonych z powyższych kopolimerów, (3) określenie możliwości enkapsulacji insuliny w otrzymanych micelach, (4) opracowanie sposobu syntezy polieterów z aminowymi grupami bocznymi oraz zbadanie ich cytotoksyczności, (5) zbadanie zdolności tych kationowych polimerów do kompleksowania DNA i zdolności do transfekcji otrzymanych polipleksów. Kolejne rozdziały opisują wyniki prac eksperymentalnych prowadzonych przez doktoranta oraz jego współpracowników (co istotne, jasno podany został zakres prac, głównie badań biologicznych, wykonanych przez inne osoby niż doktorant).

Doktorant do otrzymania nowych polimerów wykorzystał polimeryzację anionową, która pozwala na otrzymywanie kopolimerów blokowych, a w szczególności na bardzo dobrą kontrolę mas cząsteczkowych poszczególnych bloków (również grup końcowych), co przy zaplanowanych systematycznych badaniach było niezbędne. Szczegółowe opisy procedur eksperymentalnych, w tym oczyszczania i przygotowania monomerów oraz rozpuszczalników do syntez, wskazują na dużą biegłość doktoranta w stosowaniu polimeryzacji anionowej, która jest wymagającą metodą polimeryzacji. Otrzymane polimery zostały następnie bardzo dokładnie scharakteryzowane przy zastosowaniu szeregu metod (m.in. SEC, NMR, DLS, MS), co pozytywnie świadczy o warsztacie badawczym doktoranta i wskazuje na kompleksowe

podejście do charakterystyki otrzymanych nowych polimerów. Co ważne, w większości przypadku uzyskano bardzo dobrą zgodność pomiędzy planowanym i uzyskanym składem kopolimerów.

W dalszej części pracy przedstawione są wyniki badań dotyczące micel tworzonych z kopolimerów blokowych poliglicydotu i polilaktydu oraz związane z procesami enkapsulacji i uwalniania insuliny z tychże micel. Uzyskane przez doktoranta wyniki w tym zakresie są bardzo obiecujące głównie ze względu na wydajną enkapsulację białka w micelach, jak też jego kontrolowane w czasie uwalnianie zależne od długości bloku polilaktydu w tworzących micelach kopolimerach. Doktorant przeprowadził także poprawną interpretację uzyskanych wyników uwzględniając m.in. wyznaczone krytyczne stężenia micelizacji, rozmiary i rozkłady rozmiarów tworzonych micel.

Ostatni rozdział części eksperymentalnej dotyczy otrzymywania i charakterystyki liniowych polimerów zawierających polieterowy łańcuch główny oraz aminowe (różnych rzędów) grupy boczne. Są to nowe struktury, ważne szczególnie w kontekście zastosowań tych kationowych makrocząsteczek do tworzenia polipleksów z DNA i użycia ich jako potencjalnych nośników kwasów nukleinowych w terapii genowej. Część syntetyczna została systematycznie zaplanowana i wykonana, tak aby uzyskać polimery zawierające odpowiednio pierwszo- i trzeciorzędowe grupy aminowe oraz czwartorzędowe sole amoniowe. Doktorant pokazał m.in., że polimery te tworzą efektywnie polipleksy z DNA oraz, że ich cytotoksyczność zależy od ich masy cząsteczkowej i rzędowości grup aminowych. Chociaż polimery zawierające czwartorzędowe sole amoniowe okazały się obiecującymi kandydatami do pełnienia roli nośników DNA, to niestety, nie okazały się efektywne w transfekcji, najprawdopodobniej ze względu na zbyt duże rozmiary tworzonych polipleksów z DNA. Mimo tego, przedstawione przez doktoranta wyniki badań wniosły dużo nowych informacji w zakresie projektowania polimerowych nośników DNA, a otrzymane polimery mogą stanowić aktywne fragmenty innych struktur polimerowych wykorzystywanych w celu transfekcji genów.

Moja generalna ocena przedstawionej rozprawy doktorskiej jest pozytywna. Rozprawa jest napisana poprawnie merytorycznie i stylistycznie z niewielką liczbą błędów literowych, co świadczy również o dużej dbałości w przygotowaniu edytorskim całej rozprawy. Jedyną moją

zasadniczą uwagą nomenklaturową jest używanie w rozprawie pojęcia „ciężaru cząsteczkowego”, który powinien być podawany w jednostkach siły, na określenie „masy cząsteczkowej”.

Nie sposób odnieść się w niniejszej recenzji do wszystkich, moim zdaniem wartościowych wyników badań, ale z racji roli recenzenta muszę odnieść się do pewnych wątpliwości i uwag polemicznych w tym zakresie:

(1) Dla polimerów PGL-b-PLLA warto byłoby podać stopnie konwersji. W szczególności jeśli stopnie konwersji dla syntezy bloków PGL otrzymywanych w pierwszym etapie nie wynoszą 100%, to pozostałości monomeru mogłyby uczestniczyć także w otrzymywaniu bloków PLLA wbudowując się w nie. Czy istnieje tak możliwość w wykorzystywanej procedurze polimeryzacji?

(2) Zgodnie z nadmienionym przez doktoranta (rys. 35) mechanizmem reakcji przeniesienia aktywności łańcucha na monomer podczas polimeryzacji EGE, udział tej niepożądanego reakcji rośnie wraz ze wzrostem stosunku monomeru do inicjatora. Największy ten stosunek był dla syntezy PGL-b-PLLA3. Czy można skorelować stosunkową dużą dyspersję dla tego polimeru z reakcją przeniesienia, czy też należy uwzględnić inne możliwe procesy?

(3) Dlaczego stężenie insuliny niezbędne do obliczenia wydajności jej enkapsulacji w micelach było wyznaczane inną metodą niż stosowana przy badaniu procesu jej uwalniania?

(4) Na stronie 99 doktorant podaje, że uwalnianie insuliny z PGL-b-PLLA1 w początkowej fazie odbywało się według kinetyki pierwszego rzędu, ale nie wskazuje jak to zostało wykazane. Jakiej zależności stężenia od czasu należałoby się w takim przypadku spodziewać?

(5) Przedstawione na rys. 52 profile uwalniania insuliny mogłyby zostać opisane (odpowiednie dopasowanie numeryczne) jedną z wielu krzywych typowych dla procesu uwalniania substancji z nano- lub mikrocząstek (np. funkcja Weibulla). Czy były podjęte takie próby?

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa stanowi bardzo interesujący wkład w badania nad polimerami i układami nano- i mikrocząstkowymi służącymi jako nośniki substancji aktywnych biologicznie. Pan mgr inż. Mateusz Gosecki wykazał się bezsprzecznie

umiejętnością planowania i wykonywania zaawansowanych badań naukowych oraz poprawnego opisu eksperymentów i wyciągania rzetelnych wniosków z uzyskanych wyników. Oceniając pozytywnie recenzowaną pracę stwierdzam, że spełnia ona wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę, zatem do Wysokiej Rady Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Mateusza Goseckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 14 sierpnia 2015 roku

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Szczepan Zapotoczny', written in a cursive style.

Szczepan Zapotoczny