



Prof. dr hab. Maria Nowakowska  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Jagielloński  
Gronostajowa 2  
tel: ( 48 12) 686 2234  
email:nowakows@chemia.uj.edu.pl

## **O C E N A**

**pracy doktorskiej Pana mgr Bartłomieja Kosta**

**zatytułowanej: „Supramolekularne polilaktydy jako potencjalne nośniki związków biologicznie aktywnych”**

Praca doktorska Pana mgr Bartłomieja Kosta została przygotowana w Zakładzie Chemii Polimerów Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi pod opieką promotorską Pana dr hab. Tadeusza Bieli, prof. CBMiM PAN i Pana dr inż. Marek Brzezińskiego, pełniącego funkcję promotora pomocniczego.

Celem badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej było otrzymanie nowych supramolekularnych materiałów polimerowych i wykazanie ich przydatności jako nośników substancji biologicznie aktywnych. Szczególnym obiektem badań były materiały otrzymywane z gwieżdzistych polilaktydów modyfikowanych  $\beta$ -cyklodekstryną,

wprowadzaną do makrocząsteczki w procesie polimeryzacji, w którym to procesie, metylowana pochodna  $\beta$ -cyklodekstryny pełniła rolę inicjatora polimeryzacji laktydu. W wyborze obiektu badań Doktorant kierował się potrzebą optymalizacji właściwości polimerowych nośników substancji biologicznie aktywnych. Założył, że układy te powinny być przygotowane z możliwie dobrze zdefiniowanych, biozgodnych i biodegradowalnych komponentów, a jednocześnie umożliwiać efektywną enkapsulację molekuł substancji biologicznie aktywnych, ich ochronę przed czynnikami środowiskowymi i kontrolowane uwalnianie. W tym kontekście uzasadnione jest Jego zainteresowanie modyfikowanymi cyklodekstryną polilaktydami umożliwiającymi enkapsulację substancji aktywnych poprzez tworzenie kompleksów inkluzyjnych i ich stabilizację poprzez tworzenie stereokompleksów przez enancjomery poli-L-laktydu (PLLA) i poli-D-laktydu (PDL).

Cel badań został dobrze zarysowany, a obiekt badawczy racjonalnie wybrany. Tematyka pracy jest ważna i dobrze wpisuje się w aktualne nurty badań dotyczących poszukiwania nowych biomateriałów, w tym efektywnych i bezpiecznych nośników leków.

Rozprawa doktorska została przedstawiona w postaci cyklu 4 publikacji (3 prace oryginalne i 1 przeglądowa) opublikowanych w specjalistycznych czasopismach naukowych o cyrkulacji międzynarodowej (łącznie **IF = 14.196**), uzupełnionego autoreferatem. O kluczowej roli Doktoranta w badaniach, których wyniki są przedmiotem tych publikacji świadczy, znajdująca się w dokumentacji, treść oświadczeń współautorów oraz fakt, że we wszystkich tych publikacjach jest On pierwszym autorem, a w trzech z nich, także autorem korespondencyjnym. Nie mam więc wątpliwości, że przedstawione publikacje stanowią oryginalny dorobek naukowy Pana mgr Kosta i spełniają kryteria formalne stawiane rozprawom doktorskim.

Ocena merytoryczna przedstawionej rozprawy jest ułatwiona tym, że tworzące ją prace były już poddane ocenom recenzentów powołanych przez redakcje czasopism, w których zostały one opublikowane.

Istotne aspekty oceny rozprawy doktorskiej dotyczą poszukiwania odpowiedzi na pytanie o jej spójność tematyczną oraz o to czy przedstawione w publikacjach wyniki badań pozwoliły na zrealizowanie założonego celu. Analiza przedstawionych materiałów pozwala mi na udzielenie pozytywnych odpowiedzi na oba te pytania.

Etapem wyjściowym, łączącym wszystkie realizowane przez Doktoranta nurty badawcze, była synteza serii, charakteryzujących się dobrze kontrolowanymi masami cząsteczkowymi i niskimi stopniami dyspersji, gwiazdzistych polilaktydów w procesie

polimeryzacji laktydu. Przebiegający z otwarciem pierścienia laktydu proces katalizowany był przy użyciu oktanianu cyny ( $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ), a inicjowany metylovaną- $\beta$ -cyklodekstryną (M $\beta$ CD). Celem uzyskania materiału odniesienia – nie posiadającego zdolności do tworzenia kompleksów inkluzyjnych, polimeryzację laktydu inicjował Doktorant przy użyciu dipentaerytrytolu (DPE). Otrzymane materiały poddał starannej charakteryzacji stosując szereg fizykochemicznych technik badawczych.

W badaniach wszystkich kompleksów inkluzyjnych substancji biologicznie aktywnych wykorzystał techniki spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (1D NMR, 2D NMR, ROESY NMR) oraz spektrometrii masowej z detekcją ruchliwości jonów (IM-MS).

W poszczególnych etapach badań otrzymane materiały posłużyły Panu mgr Kostowi do otrzymania kolejno: nanostrukturalnych i mikrostrukturalnych nośników wybranych leków oraz bioaktywnych (antybakteryjnych) włókien.

W pracy, która została opublikowana w *European Polymer Journal*, **120**, 109-271, **2019**, Doktorant przedstawił wyniki badań dotyczące otrzymywania i zastosowania nanostrukturalnych układów potencjalnie przydatnych do dostarczania leków antynowotworowych. Stosując metodę strąceniową (nanoprecipitacja) otrzymał nanocząstki z modyfikowanych cyklodekstryną polilaktydów oraz z polilaktydów, których polimeryzację inicjował przy użyciu DPE. Otrzymywane obiekty stabilizowane były wprowadzonym do układu biokompatybilnym surfaktantem polimerowym i miały pożądane rozmiary (średnica 100-175 nm), niskie stopnie dyspersji oraz wykazywały stabilność w buforze fosforanowym w temperaturze 37°C. Nanocząstki zawierające struktury cyklodekstryny wykazywały zdolność do niezwykle efektywnej, bo przekraczającej 90%, enkapsulacji doksorubicyny (DOX) (leku przeciwnowotworowego). Fakt, że nanocząstki przygotowane z polilaktydu otrzymanego w obecności DPE nie solublizowały DOX stanowił potwierdzenie kluczowej roli oddziaływań supramolekularnych w tym procesie, a także wskazał na lokalizację leku we wnękach otrzymanych nanostruktur. Przydatność nanocząstek jako potencjalnych układów do dostarczania DOX wykazał Doktorant obserwując kontrolowane długotrwałe i efektywne (sięgające 80 % po 80 godzinach eksperymentu) uwalnianie leku oraz prowadząc badania biologiczne. W badaniach *in vitro* wykorzystał dwie nowotworowe linie komórkowe (HeLa i K562) i wykazał pożądaną cytotoksyczność DOX uwalnianej z nanocząstek w tych komórkach. Zaobserwował ponadto wyższą cytotoksyczność DOX wprowadzanej do komórek HeLa w postaci nanocząstek

sporządzonych ze stereokompleksów w porównaniu z tą notowaną dla nanocząstek otrzymywanych z enancjomerów PLA, a także wykazywaną przez wolną doksorubicynę. Efekt ten wyjaśnił dobrą kontrolą profilu uwalniania, którą zapewnia szczególna stabilność strukturalna stereokompleksów. Stabilność ta była uzyskiwana dzięki fizycznemu sieciowaniu łańcuchów polimerowych przebiegającemu z udziałem tworzących się pomiędzy nimi wielocentrowych wiązań wodorowych. Co ważne, wykazał, że mechanizm działania układów nanocząsteczkowych i wolnej doksorubicyny jest podobny - lek lokowany jest głównie w jądrach komórkowych, co powinno zwiększyć efektywność procesu terapeutycznego. Podzielał opinię Doktoranta dotyczące potencjalnej praktycznej przydatności otrzymanych układów nanostrukturalnych lecz bez przeprowadzenia badań *in vivo* trudno przesądzić o ich efektywności i bezpieczeństwie.

W pracy opublikowanej w *Materials Today Communications* 25, 101 605, 2020, Doktorant przedstawił wyniki badań dotyczące otrzymywania mikrocząstek do kontrolowanego dostarczania atropiny w postaci preparatu podawanego do oczu. Motywacją do podjęcia tych badań była obserwacja dotycząca wysokiej toksyczności ogólnej atropiny i jej ograniczonej rozpuszczalności w środowisku wodnym. W wyniku spontanicznego wytrącania (w obecności atropiny) stereokompleksów gwiaździstych: poli-L-laktydu i poli-D-laktydu, w których rdzenie zbudowane były z metylo- $\beta$ -cyklodekstryny lub z DPE, Doktorant otrzymał mikrocząstki o średnicy około 2  $\mu\text{m}$ . Wykazał, że atropina jest obecna w utworzonych mikrocząstkach. Mam kilka kwestii dotyczących omawianych badań, które chciałabym przedyskutować z Doktorantem. 1) Nie jest dla mnie jasne dlaczego wydajność enkapsulacji atropiny jest taka sama w obu typach mikrocząstek (zawierających i nie zawierających cyklodekstryny), chociaż jak wykazały obliczenia teoretyczne i przeprowadzone badania doświadczalne, atropina tworzy kompleksy gość-gospodarz z cyklodekstryną. Nie wyjaśnia tej obserwacji także cytowana w omawianej publikacji praca odniesienia. Analiza wyników badań Doktoranta, w szczególności obserwowana zmiana morfologii powierzchni mikrocząstek otrzymywanych w obecności atropiny sugeruje, że atropina adsorbuje się oraz solubilizuje w materiale polimerowym zlokalizowanym głównie na powierzchni mikrocząstek (zarówno w matrycy jak i we wnękach cyklodekstryny). 2) Mam wątpliwość dotyczącą metody badania toksyczności otrzymanych mikrocząstek wykorzystującej do tego celu komórki nowotworowe zamiast komórek prawidłowych. 3) Rozważając, jak czyni to Doktorant, możliwość aplikowania mikrocząstek jako preparatu do oczu, koniecznym byłoby otrzymanie stabilnej dyspersji mikrocząstek. W pracy nie

znajduję refleksji dotyczącej tego zagadnienia. 4) Nie jest także jasne czy uzyskany profil uwalniania jest optymalny dla tej drogi podania; dawka leku podawanego do oczu powinna zapewniać stężenie terapeutyczne bezpośrednio po podaniu i w relatywnie krótkiej skali czasowej. Badania farmakokinetyki leków podawanych do worka spojówkowego oczu wskazują, że preparaty ciekłe usuwane są w ciągu 5-6 min, a najdłużej utrzymująca się tam maść, w czasie nie dłuższym niż 2 godziny. Preparaty o przedłużonym działaniu wprowadza się natomiast nie w postaci roztworu czy dyspersji a w postaci implantów lub wkładek (insertów). Analiza profili krzywych uwalniania atropiny sugeruje, że otrzymane przez Doktoranta materiały mogłyby być przydatne w takich rozwiązaniach terapeutycznych, lecz w pracy brak wzmianki dotyczącej takiej możliwości.

W pracy opublikowanej w *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 190, 110 949, 2020, Doktorant przedstawił wyniki badań dotyczących otrzymywania i właściwości antybakteryjnych włókien polilaktydowych zawierających kwercetynę, potencjalnie przydatnych jako materiały opatrunkowe. Włókniyny otrzymywał metodą elektroprzędzenia wykorzystując polilaktyd gwieździsty modyfikowany cyklodekstryną lub polilaktyd, którego makrocząsteczki zawierały rdzeń z DPE, a także polilaktyd liniowy, komercyjnie dostępny. Obserwował, że solubilizacja kwercetyny w materiale polimerowym zapewnia jej ochronę przed utlenianiem i fotodegradacją. Testy działania antybakteryjnego otrzymanych włókien przeprowadzone dla trzech szczepów bakteryjnych: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11229 oraz *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, wykazały ich efektywność zarówno w stosunku do bakterii gram dodatnich jak i gram ujemnych. Biorąc pod uwagę narastający problem związany z lekoopornością bakterii należy zauważyć, że uzyskane wyniki są bardzo obiecujące. Nie jest jednak jasne, jaki jest mechanizm działania kwercetyny obecnej w tych materiałach ponieważ, jak wskazuje Doktorant jej dyfuzja jest zahamowana, co utrudnia jej bezpośredni kontakt z patogenami, a wszystkie proponowane w pracy, w oparciu o literaturę, potencjalne mechanizmy antybakteryjnego działania kwercetyny wymagają takiej interakcji jej molekuł z komórkami bakterii. Dla wyjaśnienia tej obserwacji można by rozważyć zastosowanie bardziej czulej (np. fluorescencyjnej) metody do detekcji kwercetyny uwalnianej z włókniyny i/lub innego mechanizmu jej działania antybakteryjnego. Doktorant zaobserwował także pozytywny wpływ obecności rdzenia cyklodekstrynowego w makrocząsteczkach PLA na właściwości użytkowe otrzymanego materiału. W szczególności wykazał, że istnieje możliwość łatwego usunięcia tego materiału z powierzchni potencjalnej rany, modelowanej przy użyciu agaru używanego w badaniach biologicznych *in vitro*.

Szkoda, że w pracy nie wyjaśnił podstaw fizykochemicznych tego zjawiska i nie analizował przyczyn różnic obserwowanych w zachowaniu pozostałych badanych materiałów polilaktydowych, nieposiadających w swych strukturach cyklodekstryny. Wyniki takich studiów poszerzyłyby znacznie wiedzę dotyczącą właściwości badanych materiałów.

Praca opublikowana w czasopiśmie *Molecules*, 25 (2020) 3404, ma charakter artykułu przeglądowego i prezentuje stan wiedzy dotyczącej zastosowania biogodnych materiałów modyfikowanych cyklodekstrynami do otrzymywania układów do dostarczania leków. Zapoznanie się z tą pracą pozwala stwierdzić, że Doktorant dobrze zna omawianą problematykę badawczą i potrafi wskazać wkład badań własnych w jej rozwój. Lekturę tej publikacji z pewnością ułatwiłaby staranna korekta edytorska.

### **Wnioski końcowe.**

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pana mgr Bartłomieja Kosta stwierdzam, że główny cel pracy został dobrze zdefiniowany, a dobór materiału i metod badawczych pozwolił na jego realizację. Zaprezentowane w pracy badania są aktualne i należą do głównego, światowego nurtu prac ukierunkowanych na otrzymywanie nowych biomateriałów, w szczególności przydatnych do uzyskiwania efektywnych a także bezpiecznych formułacji leków. Badania mają charakter studiów interdyscyplinarnych, wymagających od Doktoranta dobrego przygotowania z zakresu chemii, w szczególności chemii i fizykochemii polimerów, ale także z zakresu inżynierii materiałowej i nauk biomedycznych. Pomyślna realizacja badań była możliwa dzięki zastosowaniu szeregu nowoczesnych, komplementarnych, zarówno eksperymentalnych jak i obliczeniowych, metod badawczych. Pan mgr Kost opanował zarówno podstawy fizykochemiczne jak i zdobył kompetencje instrumentalne umożliwiające właściwy dobór technik badawczych, przeprowadzenie pomiarów i interpretację wyników. Zawarte w recenzji uwagi mają charakter uwag dyskusyjnych i nie obniżają wartości otrzymanych wyników. Doktorant przedstawił w swej rozprawie wyniki badań podstawowych, lecz osiągnięte rezultaty mogą znaleźć zastosowanie w praktyce biomedycznej.

Pan mgr Bartłomiej Kost wykazał się także dobrą znajomością literatury dotyczącej przedmiotu badań. Wyniki przeprowadzonych przez Niego badań, bezpośrednio związanych

z rozprawą doktorską zostały opublikowane w 4 pracach w recenzowanych, międzynarodowych czasopismach naukowych takich jak: *Materials Today Communication*, *Molecules*, *Eur. Polym. J.*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Doktorant jest też współautorem 6 innych publikacji naukowych. Rezultaty prowadzonych przez Niego badań stały się także przedmiotem 7 komunikatów oraz 14 prezentacji w formie plakatów na krajowych i międzynarodowych konferencjach/seminariach naukowych.

Biorąc pod uwagę powyższe uważam, że spełnione są warunki ustawy o stopniach i tytułach naukowych z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. nr 65) znowelizowanej w dniu 18 marca 2011 r. (Dz.U. 2011 nr 84 poz. 455) i wnoszę do Rady Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi o dopuszczenie Pana mgr Bartłomieja Kosta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną pracy, fakt opublikowania znacznej części zawartych w niej wyników w uznanych specjalistycznych czasopismach naukowych wnoszę o jej wyróżnienie.



Kraków 12 listopad 2020 r.