

Prof. dr hab. Barbara Trzebicka

Zabrze, 7 stycznia 2021

Opinia

o pracy doktorskiej mgr. Bartłomieja Kosta „Supramolekularne polilaktydy jako potencjalne nośniki związków biologicznie aktywnych”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr. Bartłomieja Kosta wykonana została w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN pod kierunkiem dr. hab. Tadeusza Bieli. Praca dotyczy badań różnych struktur gwieżdzistych powstałych w wyniku połączenia polilaktydów z β -cyklodekstrynową jednostką centralną i ich stereokompleksów. Prace nad polilaktydami, ich polimeryzacją i badaniami ich struktury i właściwości a także tworzenie i charakterystyka stereokompleksów są prowadzone w CBMiM PAN od wielu lat. Zarówno wcześniejsze prace wykonane w CBMiM PAN, jak obecna praca doktorska zawierają wiele elementów pozwalających myśleć o dalszym praktycznym wykorzystaniu opracowanych materiałów.

Polilaktydy zajmują bardzo ważne miejsce wśród polimerów stosowanych w medycynie ze względu na specjalne właściwości, które wynikają ze struktury tych polimerów uzyskiwanych z cyklicznych diestrów kwasu mlekowego zawierających dwa centra asymetrii. Rozkład tych centrów w łańcuchach polilaktydów decyduje o taktyczności polimeru i wynikających stąd właściwościach. Polilaktydy są biodegradowalne dzięki rozpadowi wiązań estrowych na drodze degradacji hydrolitycznej i enzymatycznej. Polimery te są najszerzej badany i najlepiej opisanym tworzywem otrzymanym z surowców szybko odnawialnych. W medycynie wykorzystywane są do produkcji materiałów opatrunkowych, resorbowalnych nici chirurgicznych, implantów, stentów, łączników i śrub do spajania złamanych kości. Wykonuje się z nich rusztowania do odtwarzania tkanek. Stosowane są coraz szerzej w kosmetologii. Bardzo szeroko badane są polilaktydowe systemy uwalniania leków.

Problemy poruszone w pracy doktorskiej pana mgr. Kosta wpisują się w szeroko obecnie badane zagadnienia związane z nośnikami substancji biologicznie aktywnych otrzymywanych z wykorzystaniem polilaktydów. Opracowanie nośnika wymaga dokładnej charakterystyki wykorzystywanych do tego celu polimerów, znajomości ich organizacji do nano- lub mikrocząstek, efektywności

enkapsulacji ładowanej substancji i jej uwalniania. Badania muszą obejmować wpływ nośnika na komórki, jego cytotoksyczność i biogodność oraz informować o efektywności enkapsulacji i procesach uwalniania substancji czynnej.

Przedstawiona praca doktorska obejmuje trzy publikacje zawierające wyniki prac badawczych i jedną pracę przeglądową. Jest zaopatrzona w dwudziestostronicowe wprowadzenie, w którym Autor zawarł krótki wstęp literaturowy, nakreślił cel i podsumował swoje badania.

Wprowadzenie jest napisane poprawnie i starannie zaplanowane. Zawiera skrótowe omówienie literatury ważnej dla prezentowanych w pracy doktorskiej zagadnień, pomagające w późniejszej analizie własnych wyników Autora rozprawy. Przeprowadzone badania są omówione bardzo syntetycznie, w niektórych miejscach wprowadzenia jednak trochę zbyt skrótowo. Wprowadzenie zawiera niewiele błędów stylistycznych i tylko kilka nie w pełni zręcznych sformułowań.

Na wstępie do opisu prac własnych, w rozdziale 3.2, Autor zebrał uzyskane przez siebie wyniki dowodzące inkluzji substancji niskocząsteczkowych do wnętrza metyloowanej β -cyklodekstryny (M β CD) jako modelowej cząsteczki. Analizował oddziaływania między M β CD a cząsteczkami substancji aktywnych wykorzystywanych w pracy: atropiną, kwercetyną i doksorubicyną. Przesunięcia chemiczne w widmach ^1H NMR potwierdziły występowanie oddziaływań cząsteczka/M β CD. Doktorant udowodnił powstanie kompleksu inkluzyjnego przy pomocy badania efektu Overhausera dla atropiny i doksorubicyny. Dla układu atropina/cyklodekstryna analizował także szczegółowo widma masowe uzyskane metodą spektroskopii masowej z detekcją ruchliwości jonów wykazując powstania kompleksu inkluzyjnego.

Forma przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej wymaga od recenzenta dokładnej analizy załączonych publikacji już wcześniej zrecenzowanych w czasopismach naukowych. Siłą rzeczy analiza ta prowadzi nie tylko do przyjrzenia się badaniom lecz czasem stanowi uzupełnienie już wykonanych recenzji.

W pierwszej omawianej **publikacji 1** Autor wykorzystał otrzymane w wyniku syntezy z użyciem monomerów D- lub L-laktydu na inicjatorze metylo- β -cyklodekstrynie (M β CD) gwieżdźdźiste polilaktydy do wytworzenia agregatów gwiazd enancjomerycznych i stereokompleksowych. Tworzenie stereokompleksów potwierdzone zostało w badaniach FTIR. Otrzymane struktury posłużyły jako nośniki doksorubicyny. W pracy porównano efektywność enkapsulacji, szybkość uwalniania leku i stabilność stereokompleksowych agregatów z agregatami gwiazd enancjomerycznych oraz agregatami 6-ramiennych polilaktydów z dipentaerytryolem jako elementem centralnym. Aby zapobiec agregacji i zwiększyć stabilność dyspersji nanocząstek w trakcie ich wytwarzania, stosowano niejonowy powierzchniowo-czynny kopolimer PEGME-b-PDLLA w ilości ok 20 do 30% wa-

gowych. Pewne utrudnienie dla czytającego stanowi brak w głównym tekście publikacji 1 informacji o masach molowych polimerów gwieżdzistych. Autor podaje te masy na chromatogramie (Fig.S3) w Supporting Information (lecz bez wyjaśnienia). Stanowi to niewątpliwą trudność dla czytającego. Autor dokładnie bada rozmiary stosując dynamiczne rozpraszanie światła i mikroskopię sił atomowych. Uzyskane wyniki są bardzo zbliżone. Przyjmując masy gwiazd „unimolekularnych” z Fig. S3 z SI (12 000g/mol) można wywnioskować, że zagregowane struktury nie są, w rozumieniu definicji IUPAC, micelami jak pokazano w publikacji 1 na rysunku 1. Rozmiary nanocząstek są zbyt duże, aby odpowiadały strukturze typowej miceli core-shell. Są to więc agregaty, niewykluczone, że agregaty miceli (tzw. multimicelarne agregaty).

Autorzy stwierdzili, że nanocząstki gwiazd polilaktydowych są stabilne w PBS, przy czym nanocząstki stereokompleksów wykazują większą stabilność niż nanocząstki enancjomerów. Obserwacja ta jest istotna dla ewentualnego dalszego wykorzystania otrzymanego materiału.

Autor dokładnie zbadał cytotoksyczność pustych nanocząstek i nanocząstek zawierających doksorubicynę wykorzystując dwie linie komórkowe HeLa i K562. Zauważył, że nanonośniki polilaktydowe wykazują wyższą toksyczność niż wolna doksorubicyna, a nośniki na bazie stereokompleksów mają lepsze właściwości przeciwnowotworowe niż nośniki z gwiazd enancjomerycznych, co wiąże autor ze stabilnością agregatów. Oddziaływanie nośników doksorubicyny na komórki jest skuteczniejsze niż wolnej doksorubicyny, choć stężenie leku w komórkach w wypadku stosowania polilaktydowych nośników jest w niższe.

Pomysł opracowania nanocząstek na bazie gwiazd polilaktydowych, zbadania ich właściwości i wykorzystania jako nośników jest bardzo ciekawy i stanowi istotne rozszerzenie badań nad polilaktydowymi nanocząsteczkami.

W kolejnej pracy (**publikacja 2**) Autor przedstawił wyniki badań nad włóknami PLA zawierającymi słabo rozpuszczalny, łatwo ulegający rozkładowi flawonoid kwercetynę. Takie właściwości substancji biologicznie aktywnej wymagają jej zabezpieczenia. Autor przygotował odpowiednie włókniny, które spełniałyby taką rolę i mogły być wykorzystane jako opatrunki. Do wytworzenia włókien wykorzystano komercyjny polilaktyd z 97% zawartością jednostek L-laktydowych (87000 g/mol), enancjomeryczne 7-ramienne gwiazdy poli(D-laktydu) z rdzeniem M β CD różniące się masą molową (75000 i 20000 g/mol) oraz 6-ramienne gwiazdy PDLA z rdzeniem z dipentaerytrylołu. Do gwiazd polilaktydowych dodawano kwercetynę. Włókna polilaktydowe otrzymywano poprzez elektroprzędzenie stosując różne warunki procesu. Ze schematu 1 wynika, że włókna przygotowywano z gwiazd polilaktydowych i w mieszankach z komercyjnym polilaktydem po wcześniejszym ich załadowaniu fawonoidem. Byłoby ułatwieniem dla czytającego, gdyby opis procesu (rozdział 2.4, publikacja 2) był jaśniejszy i lepiej odpowiadał temu schematowi. Autor nie obserwował tworzenia się stereokompleksu w czasie wytwarzania włókien w blendach komercyjnego

PLA/gwiazda PLDA. Byłoby interesujące poznanie opinii Autora, co zatem może powodować, że włókna z tej mieszaniny wykazywały lepszą zwartość i słabszą adhezję do podłoża hodowlanych (patrz niżej). We włóknach, do których wykonania wykorzystano gwiazdy PLDA z rdzeniem M β CD, część cząsteczek flawonidu tworzyła kompleks inkluzyjny z rdzeniami, pozostałe były silnie zaadsorbowane do powierzchni włókien lub znajdowały się w ich środku.

Zbadano właściwości przeciwbakteryjne uzyskanych włókien względem trzech typów bakterii. Nie obserwowano dyfuzji flawonoidu do pożywki, natomiast obserwowano silne hamowanie wzrostu bakterii w miejscach kontaktu wytworzonych włókien z pożywką. Porównano względną czułość bakterii w obecności otrzymanych włókien PLA zawierających kwercetynę z tymi wielkościami uzyskanymi w obecności antybiotyków. Nie odnotowano uwalniania flawonoidu z włókien w PBS, co potwierdza, że substancja jest uwięziona silnie we włóknach polilaktydowych. Analiza widma UV włókien z kwercetyną pozwoliła jednoznacznie wykazać, że flawonoid zawarty we włóknach jest odporny na fotooksydację po miesięcznej ekspozycji na powietrze i światło. Te pozytywne właściwości badanych włókien nie wystarczają jednak, jak podkreśla Autor, do możliwego przyszłego ich wykorzystania w praktyce. Przeszkadza temu silne przyleganie włókien do podłoża hodowlanych i ich strzępienie się przy odrywaniu. Istotną poprawę tych właściwości wykazywała włóknina, wytworzona z gwiazdy M β CD-PDLA lub mieszaniny komercyjny polilaktyd/M β CD-PDLA.

Pomimo pewnych niepożądanych cech włókna PLA z kwercetyną mogą być punktem wyjścia do opracowania rzeczywistych opatrunków przeciwbakteryjnych. Poprawa właściwości mechanicznych zawierających kwercetynę polilaktydowej włókniny z gwiazdami PLA jest tylko kwestią odpowiedniej optymalizacji materiału. Istotna jest tu przede wszystkim udowodniona większa efektywność takich włókien w porównaniu do włókien zawierających antybiotyki.

Autor wykorzystał otrzymane wcześniej i stosowane do tworzenia nanocząstek polilaktydów polimery gwieżdziste M β CD-PDLA, M β CD-PLLA, DPE-PLLA, DPE-PDLA do wytworzenia mikrosfer. Mikrosfery były nośnikami atropiny, która jest stosowana jako lek, lecz dostarczana bezpośrednio wywołuje wiele niepożądanych efektów ubocznych. Prace nad jej enkapsulacją w odpowiednim nośniku są więc istotne i stanowią otwarty problem warty zbadania. Swoje badania dotyczące tego zagadnienia Autor opisał w **publikacji 3**.

Mikrosfery służące jako nośniki atropiny były uzyskiwane w procesie spontanicznego wytrącania zagregowanych stereokompleksów w mieszaninach enancjomerycznych gwiazd PLA. W tabeli S1 umieszczonej w SI tej publikacji Autor podaje masy molowe stosowanych gwieżdzistych PLA i ich ramion. Wielkości obliczone na podstawie danych z reakcji zgadzają się z wynikami GPC MALLS, inaczej niż to podano w Tabelicy 1 Wstępu do rozprawy. Tam różnica mas jest kilkukrotna. Proces

otrzymywania stereokompleksów zarówno pustych jak i załadowanych atropiną optymalizowano, prowadzono dla różnych rozpuszczalników i stężeń uzyskując z powodzeniem mikrosfery o wymaganych rozmiarach i ich niewielkiej dyspersji.

Stosując spektroskopię masową z detekcją ruchliwości jonów Autor w jasny sposób wykazał tworzenie się niekowalencyjnych kompleksów powstających pomiędzy atropiną a częściowo metylowaną cząsteczką cyklodekstryny.

Badania uwalniania atropiny z nośników wykazują, że następuje ono znacznie wolniej z nośników zawierających gwiazdy z rdzeniem M β CD niż utworzone przez stereokompleksy polilaktydów z dipentaerytryolem jako jednostką centralną. Działo się tak pomimo, że te ostatnie były zdecydowanie bardziej krystaliczne niż znajdujące się w mikrosferach polilaktydy z rdzeniem z M β CD. Autor wykazał, że cząsteczki atropiny ulegają inkluzji do wnęki CD. Oddziaływania atropiny z atomami wnęki, rozkład cząsteczek atropiny w mikrosferze i tworzenie stereokompleksu odpowiada za obniżenie szybkości dyfuzji leku z wnętrza nośnika w porównaniu z nośnikiem utworzonym przez gwiazdy DPE-PLA. Dawka atropiny uwalnianej z wnętrza mikrosfery M β CD/PLA jest dwukrotnie niższa niż uwalniana z DPE-PLA w tych samych odstępach czasu.

Cytotoksyczność pustych i zawierających atropinę mikrosfer zbadano względem dwóch linii komórek nowotworowych HeLa i PC-3. Obserwowany spadek przeżywalności wynosił ok 50% dla HeLa i nieco mniej dla PC-3. Ponieważ w zamysle atropina miałaby być dystrybuowana w organizmie poprzez podanie do oka, wydaje się, że bardziej zasadne byłyby badania względem komórek rogówki a nawet fibroblastów czy keratynocytów a nie komórek nowotworowych.

W publikacji 3 można trafić na kilka błędów w pisowni wyrazów szczególnie w Części eksperymentalnej. W tekście pracy znalazły się też pewne niejasne sformułowania np. „smooth microspheres with roughness on the Surface” (page 101605), czy określenie ok. 20 % spadku przeżywalności komórek jako „slightly”.

Ostatnią publikacją włączoną w cykl rozprawy doktorskiej (**publikacja 4**) jest przegląd literaturowy „Biocompatible polymers combined with cyclodextrins: fascinating materials for drug delivery applications”. Systematyzuje ona dotychczasowe prace nad różnego typu nośnikami substancji biologicznie aktywnych wytwarzanymi z użyciem supramolekularnych systemów cyklodekstryna/polimer. W przeglądzie omówiono także rolę kompleksów tworzących się w wyniku inkluzji substancji niskocząsteczkowej we wnęce tych oligosacharydów w procesach kontrolowanego uwalniania. Zapoznanie się z publikacją przeglądową pozwala na uzupełnienie informacji tylko bardzo skrótowo opisanych we wstępie do rozprawy. Pozwala także ocenić wkład prac prezentowanych w rozprawie do badań nad rolą cyklodekstryn w systemach dostarczania leków.

Do przeprowadzenia zaplanowanych badań Autor rozprawy musiał zapoznać się z wieloma technikami eksperymentalnymi i z powodzeniem, bardzo skutecznie je wykorzystał do przeprowadzenia dowodów swoich tez.

Podkreślić należy, że Autor systematycznie i spójnie zbadał nano- i mikronośniki enancjomerycznych polilaktydów z β -cyklodekstrynową jednostką centralną i agregaty ich stereokompleksów, ustalił w jaki sposób enkapsulują one i uwalniają odpowiednio doksorubicynę i atropinę. Z użyciem enancjomerycznych liniowych i gwieździstych polilaktydów otrzymał włókna zawierające kwercetynę i ocenił ich przydatność do wytworzenia opatrunków, Praca odpowiada na wiele pytań związanych z nośnikami wykorzystującymi zjawisko inkluzji substancji niskocząsteczkowej do wnętrza cyklodekstryny i stanowi istotny wkład w te badania.

Przeprowadzone przez Autora rozprawy prace wskazują także na wiele problemów, które pozostają jeszcze do rozwiązania i otwierają możliwości dalszych badań nad gwieździstymi polilaktydami.

Uwagi zawarte w recenzji w najmniejszym stopniu nie podważają wartości osiągniętych i ujętych w pracy wyników. Praca zawiera wiele bardzo cennych z poznawczego punktu widzenia rezultatów, które mogą stanowić punkt wyjścia do aplikacyjnego wykorzystania rozgałęzionych polilaktydów.

Należy zwrócić także uwagę na bardzo dużą aktywność Autora rozprawy doktorskiej w upowszechnianiu wyników swoich prac. Oprócz czterech publikacji ujętych w rozprawie, których Doktorant był pierwszym autorem, dorobek Jego obejmuje jeszcze 6 dodatkowych prac, wykraczających poza tematykę pracy doktorskiej. Ponadto prace mgr. Kosta były prezentowane na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych w formie 21 komunikatów i posterów.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca mgr. Bartłomieja Kosta spełnia wymagania określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003, nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i zwracam się do Rady Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN o dopuszczenie mgr. Bartłomieja Kosta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, ze względu na dużą merytoryczną wartość ocenianej pracy, krótki czas jej powstania, oraz opublikowanie wyników w dobrych i bardzo dobrych periodykach naukowych wnoszę o wyróżnienie pracy.

B. Trzebicka