

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. inż. Łukasza Lamch pt. ***SYNTEZA I WŁAŚCIWOŚCI NOWYCH
FUNKCJONALIZOWANYCH MICEL POLIMEROWYCH O ZNACZENIU
TERAPEUTYCZNYM***

(promotor: prof. dr hab. inż. Kazimiera A. Wilk)

W przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej omówiono układy micelarne stosowane jako nośniki leków, wykorzystując solubilizację i enkapsulację substancji hydrofobowych. W szczególności skonstruowano oraz scharakteryzowano micelle polimerowe, zawierające solubilizowane fotouczulacze z grup ftalocyjanin o zróżnicowanej hydrofobowości, jako nano-nośniki przeznaczone do przeciwnowotworowej terapii fotodynamicznej o wysokiej selektywności działania i możliwości śledzenia w układach biologicznych. Wykorzystanie micel amfifilowych kopolimerów blokowych jest nowoczesnym i ważnym sposobem transportu leków przeciwnowotworowych w organizmie, stanowi niewątpliwe wyzwanie naukowe i wymaga dalszych intensywnych badań. W tym odniesieniu praca badawcza i dysertacja mgr. inż. Łukasza Lamch są głęboko uzasadnione i potrzebne.

Rozprawa doktorska mgr inż. Łukasza Lamch wykonana na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej obejmuje 182 strony, zawiera 34 rysunki i 9 schematów (które również powinny być oznaczone jako rysunki), 22 tabele oraz 234 pozycje literaturowe. Niemal 10% cytowanych artykułów zostało opublikowanych w latach 2016-2017, co świadczy o zgłębianiu literatury przedmiotu na bieżąco. Rozprawa ma układ klasyczny: wprowadzenie, omówienie literaturowe przedmiotu, cel i zakres pracy, część doświadczalną, wyniki i dyskusję, wnioski oraz wykaz cytowanej literatury. Rozprawę otwiera streszczenie w języku polskim oraz dorobek naukowy Doktoranta. Brak jest streszczenia w języku angielskim. Przydatny byłby wykaz tabel, rysunków, skrótów i akronimów.

W opracowaniu literaturowym, obejmującym trzy rozdziały, obszernie omówiono kluczowe zagadnienia odnoszące się do funkcjonalizowanych, biokompatybilnych micel polimerowych i fotouczulaczy. Doktorant wykazał się szeroką znajomością metod syntezy amfifilowych kopolimerów blokowych (które jest trudniej otrzymać od pozostałych, chociażby z uwagi na izolowanie i oczyszczanie produktu) i ich funkcjonalizacją, przybliżając

chemizm reakcji zobrazowany rysunkami i opisem oraz mając na uwadze samoorganizację. W podrozdziałach 2.2.3. i 2.2.4., omawiających zróżnicowaną strukturę chemiczną i architekturę kopolimerów blokowych, szczególnie wyraźnie można zauważyć wysokie kompetencje mgr inż. Łukasza Lamch w projektowaniu kopolimerów. Doktorant podsumowując krótko omówienie literatury przedmiotu na końcu rozdziałów 2.2. (s. 50) i 2.3. (s. 68) nie wskazał *explicite* braków w dotychczasowej wiedzy nt. przedmiotu dysertacji. Naukowe tezy pracy ukrył w czterech celach "szczegółowych" w rozdziale *Cele i założenia pracy*.

Część doświadczalna pracy rozpoczyna się od bardzo szczegółowego opisu metodyk badawczych i analitycznych (m.in. ^1H NMR, FTIR, UV-Vis). Po zestawieniu odczynników i materiałów pomocniczych, następuje kluczowy dla dysertacji opis poszczególnych etapów syntez amfifilowych kopolimerów blokowych. Opis ten (jak i cała praca) wskazuje na niewątpliwą specjalizację Doktoranta w kierunku syntezy organicznej. Zaproponowane i zastosowane metody syntezy pozwoliły uzyskać z wysoką wydajnością amfifilowe kopolimery blokowe złożone z hydrofobowego łańcucha poliestrowego: poli(L-laktydu) (PLLA), poli(D,L-laktydu) (PDLLA) lub polikaprolaktonu (PCL) oraz hydrofilowego bloku poli(tlenku etylenu) (PEG), a także ich funkcjonalizowane analogi, zawierające przyłączone kowalencyjnie, hydrofilizowane (PEG-yłowane) ligandy (kwas foliowy, FA) lub ftalocyjaninę cynku (ZnPc).

Mgr inż. Łukasz Lamch skonstruował szereg micel polimerowych, zawierających solubilizowane fotouczulacze z grup ftalocyjanin o zróżnicowanej hydrofobowości. Ważnym etapem badań było wyznaczenie rozkładu wielkości nanonośników i morfologii za pomocą metody dynamicznego rozproszenia światła i techniki mikroskopii sił atomowych. Wszystkie micelle były mniejsze od 100 nm o wąskim rozkładzie wielkości, a więc przydatne terapeutycznie.

Bardzo zaawansowane i liczne techniki spektroskopowe zastosował Doktorant w wyznaczeniu parametrów solubilizacyjnych oraz miejsc lokalizacji i aktywności fotouczulaczy w micelach polimerowych (^1H , ^2D NOE i DOSY NMR, pomiar czasu relaksacji T_1 , XPS w połączeniu z trawieniem jonowym, UV-Vis i spektroskopia fluorescencyjna). Uzyskał wysoką wydajność solubilizacji, oczekiwaną zawartość substancji aktywnej, stabilność koloidalną i stabilność chemiczną.

W ramach oceny przydatności nanonośników Doktorant określił kinetykę procesu fotowysyblania oraz zdolność do generowania reaktywnych form tlenu dla postaci

enkapsułowanej w micelach polimerowych oraz dla postaci wolnej w środowisku wodnym. W opisie badań nie odniesiono się do temperatury, o co proszę w prezentacji pracy podczas obrony.

Badania biologiczne, w tym określenie lokalizacji wewnątrzkomórkowej otrzymanych nanośników oraz ich potencjalnej cytotoksyczności, przeprowadzone na wybranych liniach komórek nowotworowych, miały na celu potwierdzenie skuteczności i selektywności dostarczania substancji aktywnych, solubilizowanych lub związanych kowalencyjnie przez micelle polimerowe. Doktorant wykazał, że efekt cytotoksyczny pojawił się po wzbudzeniu fotouczulacza światłem o odpowiedniej długości fali i był bardziej zauważalny w przypadku komórek patologicznych. Wskazał też na korzystną - raczej mniejszą niż 10 % - zawartość kopolimeru funkcjonalizowanego kwasem foliowym w micelach.

Wielowątkowy opis metodyk pomiarowych i bardzo nowoczesna aparatura świadczy o ponadprzeciętnych zdolnościach badawczych Doktoranta. Bardzo obszerne wyniki badań i ich interpretacja są poprawne, jakkolwiek zachowanie się micel w warunkach rzeczywistych stosowania leku może być odmienne i wymaga dalszych badań. Badania NMR obciążone są znacznym błędem, bo struktura micel w polu wysokoenergetycznym w rozpuszczalniku organicznym będzie odmienna, jeśli w ogóle zachowana. Kolejnym wyzwaniem będzie teraz przejście od badań laboratoryjnych do ułamkowo-technicznych. Za niewątpliwe osiągnięcie badawcze dysertacji uznaję:

- opracowanie metodyk syntezy nowych, wybranych amfifilowych kopolimerów blokowych, przystosowanych do samoorganizacji w micelle i solubilizacji hydrofobowych fotouczulaczy,
- wykazanie, że strefa hydrofobowa rdzenia micelarnego najlepiej osłania fotouczulacze przed dezaktywacją,
- wykazanie, że efekt cytotoksyczny dla zsyntezowanych nośników pojawił się po wzbudzeniu fotouczulacza promieniowaniem o odpowiedniej długości światła,
- wskazanie najkorzystniejszej, prawie 10. procentowej zawartości kopolimeru funkcjonalizowanego kwasem foliowym w micelach,
- potwierdzenie w badaniach biologicznych, że ftalocyjanina cynku, związana kowalencyjnie z micelą, stanowi bezpieczny znacznik fluorescencyjny do śledzenia lokalizacji nanośników w komórkach.

Każdy podrozdział *Wyników i dyskusji* zawiera bardzo merytoryczną dyskusję wyników, która zasługuje na szczególne wyróżnienie. Odwołuje się tutaj aż do pięciu opublikowanych własnych artykułów. Klarowne i jednoznaczne wnioski – ze wskazaniem nowości naukowej - korespondują z postawionymi zadaniami badawczymi.

Dysertacja została starannie zredagowana, zauważyłem zaledwie kilka błędów stylistycznych, gramatycznych czy maszynowych. Nadużywane jest pojęcie *proces*, które zostało użyte w dysertacji ponad 160 razy. W ogromnej większości użycia, termin ten można w tekście pominąć, a w niektórych przypadkach zastąpić pojęciem *reakcja* lub *zjawisko*. Niezbyt fortunate jest sformułowanie *kinetyka procesu technologicznego* na str. 149. Oto inne uwagi, które się nasunęły podczas czytania pracy:

- Czy stosowane związki chemiczne znajdują się w Farmakopei Europejskiej lub Polskiej, czy mogą być dopuszczone do badań klinicznych (oczywiście droga do nich daleka)? Na ile nośniki własne leków odpowiadają indywiduum stosowanym w praktyce?
- Doktorant opracował, otrzymał i wskazał: nowe związki, nowe metody i nowe zastosowania – czy w takiej konfiguracji uzyskanie powtarzalności w perspektywie praktycznego wykorzystania jest szczególnym wyzwaniem? - proszę o komentarz.
- Jednym z obszarów badawczych była lokalizacja fotouczulacza w miceli polimerowej, czego Doktorant do końca nie sprecyzował. Jakie mogłoby być uporządkowanie całej miceli sądząc po uporządkowaniu lokalnym?
- Jakie jest rozmieszczenie fotouczulaczy w miceli - gdzie jest ich więcej we wnętrzu czy przy powierzchni? Czy Doktorant jest w stanie zaproponować model kilkudziesięcionanometrowej miceli dla stosowanych kopolimerów blokowych w oparciu o wyniki badań fizykochemicznych i rozważenie oddziaływań międzycząsteczkowych?
- Zastosowanie techniki XPS w połączeniu z trawieniem jonowym umożliwiło wykonanie profili głębokościowych micel polimerowych, jednak przeprowadzone analizy nie potwierdziły składu otrzymanych struktur. Czy technika XPS jest odpowiednia do tego typu układów? Proszę odnieść zawartość Zn we ftalocyjanianie do granicy oznaczalności dla techniki XPS.
- Jakie będą w micelach oddziaływania hydratacyjne?

- Czy badana była zawartość śladów tetrahydrofuranu i acetonu w produkcie polimerowym?
- Czy rozkład wielkości micel ("kulek") polimerowych zależy od kompozycji; w jakim stopniu wpływa na ich wielkość dodatek substancji aktywnych po enkapsulowaniu?
- *W celu i założeniach pracy Doktorant zadeklarował, że Efektem końcowym niniejszej pracy jest opracowanie metodologii syntezy, o potencjalnym znaczeniu technologicznym, prowadzącej do otrzymania stabilnych, biokompatybilnych micel polimerowych jako nanośników substancji hydrofobowych lub amfifilowych o znaczeniu przeciwnowotworowym. Czy w oparciu o Technologię Analizy Procesu (PAT) produktów leczniczych Doktorant zechciałby podczas obrony dysertacji zidentyfikować te z elementów technologii wytwarzania, które mogą istotnie wpływać na jakość produkowanego leku i efektywności cyklu produkcyjnego?*

Wartym podkreślenia jest realizacja badań zamieszczonych w dysertacji w ramach projektu pn. *Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne - BioMed*, Europejski Fundusz Rozwoju Terytorialnego, działanie 1.1.2.

Rozprawa doktorska jest bardzo obszerna, chciałoby się powiedzieć: zbyt obszerna, jak na stopień doktora. Przynajmniej część materiału - przede wszystkim już opublikowanego - mogłaby się znaleźć w dorobku habilitacyjnym, a praca doktorska - zostać złożona przynajmniej rok wcześniej - co jest ważne w karierze naukowej tak utalentowanego i o wielkich predyspozycjach naukowego badacza, którym jest Doktorant.

Podsumowanie

Mgr inż. Łukasz Lamch włączył się w elitarne w Polsce badania nad nowymi nośnikami leków, otrzymał w skali laboratoryjnej nowe nośniki i wykazał, że micelle kopolimeru mPEG-b-PLLA dostarczają do komórek nowotworowych fotoaktywną formę ftalocyjaniny cynku. W badaniach zaprojektował struktury i zsyntezował funkcjonalizowane kopolimery blokowe oraz opracował sposób otrzymywania micel polimerowych, wskazując na ich możliwości aplikacyjne, oraz opracował sposób solubilizacji wybranych fotouczulaczy. W tym odniesieniu, uznaję dysertację mgr inż. Łukasza Lamch za dojrzałą pracę naukową, która wnosi nowe wartości do podstaw chemicznych i biochemicznych wytwarzania nośników leków i układów transportu związków o znaczeniu terapeutycznym.

Część literaturowa stanowi przejrzyste kompendium wiedzy na temat micel polimerowych i fotouczulaczy, a zarazem syntezy amfifilowych kopolimerów blokowych. W

części badawczej mgr inż. Łukasz Lamch na podstawie starannie zaplanowanych i przeprowadzonych badań dokonał wyczerpującej i oryginalnej dyskusji uzyskanych wyników. Szczególną zaletą wykonanych badań, podnoszącą ich wiarygodność, było wykorzystanie szeregu równoległych zaawansowanych technik instrumentalnych. Tym samym Doktorant zrealizował postawiony sobie cel pracy oraz wykazał się umiejętnością prowadzenia samodzielnych badań naukowych. Przedstawione w pracy badania są metodologicznie poprawne, a uzyskane wyniki są ważne zarówno z naukowego, jak i praktycznego punktu widzenia. Zasygnalizowane w recenzji uwagi krytyczne mają przede wszystkim charakter dyskusyjny i nie umniejszają wartości naukowej i praktycznej dysertacji.

Dysertacja mgr inż. Łukasza Lamch spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym. W tym odniesieniu stawiam wniosek do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o **dopuszczenie** Autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kluczowe wyniki, stanowiące odniesienie do celu i zakresu pracy, zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu a sama praca stanowi kompendium wiedzy o wysokich walorach poznawczych i praktycznych, dlatego proponuję **wyróżnienie** ocenianej dysertacji.

