



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Prof. dr hab. Szczepan Zapotoczny
Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków
tel. 12 686 2530
Email: zapotocz@chemia.uj.edu.pl

RECENZJA

Wydział Chemii

**Rozprawy doktorskiej mgr inż. Sławomira Jana Drozdka
pt.: "Synteza i właściwości nanonośników polimerowych dla
zastosowań teranostycznych"**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr inż. Sławomira Drozdka obejmuje zagadnienia związane z otrzymywaniem, charakterystyką fizykochemiczną nowych nanokapsuł polimerowych z rdzeniem olejowym oraz ocenę ich przydatności jako nanonośników substancji terapeutycznych i diagnostycznych. Doktorant pod opieką promotorską Pani prof. dr hab. Kazimiery Wilk oraz Pani dr Urszuli Bazylińskiej (promotor pomocniczy) opracował metodologię otrzymywania wspomnianych nanonośników stosując nanoprecypitację oraz metodę emulsyjno-dyfuzyjną. Badania te wpisują się w tematykę rozwijaną od wielu lat w grupie Pani Promotor i lokują się w najbardziej aktualnych zagadnieniach dotyczących polimerowych układów do dostarczania leków, a w szczególności ich zastosowań w teranostyce. Nanoinżynieria takich układów wymaga interdyscyplinarnego podejścia uwzględniającego (1) odpowiedni dobór składników tworzących nanonośniki o pożądanej strukturze, rozmiarze, zdolności do enkapsulacji, właściwościach biologicznych itp., ale także (2) właściwy wybór substancji terapeutycznych i diagnostycznych oraz (3) charakterystykę fizykochemiczną, mikroskopową i biomedyczną otrzymanych nośników wraz z przenoszonymi substancjami aktywnymi.

Recenzowaną rozprawę doktorską rozpoczyna część literaturowa poprzedzona streszczeniem pracy oraz krótkim wprowadzeniem, w którym Doktorant nakreślił tło i istotność podejmowanych badań w kontekście aktualnych problemów z dostarczaniem hydrofobowych farmaceutyków do organizmu człowieka. Poszczególne rozdziały części literaturowej omawiają zagadnienia bezpośrednio związane z przedmiotem pracy w dość wyczerpującym zakresie. Pierwszy z tych rozdziałów w sposób systematyczny omawia nanonośniki stosowane w technologii farmaceutycznej, ze szczególnym uwzględnieniem ich otrzymywania techniką nanoprecypitacji oraz emulsyjno-dyfuzyjną. Kolejny rozdział stanowi klarowny przegląd dotyczący koenkapsulacji substancji diagnostycznych i terapeutycznych w układach koloidalnych. Doktorant przedstawił w nim zestawienia zarówno czynników diagnostycznych używanych w różnych technikach bioobrazowania np. (MRI, PET), ze szczególnym uwzględnieniem znaczników fluorescencyjnych (także kropek kwantowych), jak też przykłady enkapsulowanych terapeutyków, używanych głównie w terapiach przeciwnowotworowych, w tym fotouczulaczy stosowanych w terapii fotodynamicznej. Ostatni rozdział koncentruje się na opisie mechanizmów transportu i wnikania nanośników w organizmach żywych z rozróżnieniem pasywnego i aktywnego dostarczania leków poprzez nośniki.

Cała część literaturowa pracy zajmuje prawie 50 stron, odwołuje się do bardzo obszernej literatury w przedmiocie, a przedstawiony opis wspomnianych wyżej zagadnień jest wyczerpujący. Napisana jest ona merytorycznie poprawnie, w sposób przejrzysty i systematyczny. Świadczy to o zgłębieniu przez doktoranta tematyki rozprawy doktorskiej, a czytelnikowi daje bardzo dobre tło dla motywacji podejmowanych badań oraz wprowadzenie do opisywanych dalej zagadnień. Uważam, że może ona być podstawą do publikacji przeglądowej dotyczącej wykorzystania nanonośników w teranostyce.

Część eksperymentalną poprzedza przedstawienie celu i założeń pracy. Doktorant podkreśla w nim ważne cele technologiczne w zakresie koenkapsulacji substancji diagnostycznych i terapeutycznych w nanonośnikach o pożądanych cechach farmakokinetycznych i farmakodynamicznych, które umożliwiają rozwój medycyny spersonalizowanej. W tym kontekście Doktorant stawia sobie jasno cele pracy doktorskiej nie tylko w zakresie metod otrzymywania nanoukładów teranostycznych, ale także wskazuje na warunki dotyczące rozmiarów, stabilności nośników oraz możliwość skalowania syntezy, co razem wskazuje na potencjał aplikacyjny nowych układów w terapiach

antynowotworowych oraz bioobrazowaniu. Ważnym elementem pracy było także założenie przeprowadzenia badań in vitro otrzymanych układów w kontekście ich potencjalnych zastosowań biomedycznych.

Część eksperymentalna zawiera na początku szczegółowe przedstawienie użytych materiałów oraz metodologii badań zmierzających do osiągnięcia założonych celów. Opisy obejmują zarówno metody otrzymywania nanokapsuł, ich ładowania substancjami aktywnymi, jak też metody ich charakterystyki (m.in. spektroskopia absorpcyjna UV/Vis, spektroskopia fluorescencyjna, dynamiczne rozpraszanie światła (DLS), mikroskopia sił atomowych (AFM), transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)).

W rozdziale 5.1. opisane i przedyskutowane są wyniki prac badawczych dotyczących nanokapsuł otrzymywanych metodą nanoprecypitacji z enkapsulowanymi barwnikami fluorescencyjnymi (Czerwień Nilu i Kumaryna 6) oraz wybranym cytostatykiem - paklitakselem. Kluczowym etapem badań była optymalizacja metod otrzymywania nanokapsuł głównie poprzez modyfikację składu (np. rodzaj i stężenie użytego polimeru, fazy olejowej) przy zachowaniu stałych warunków mieszania, czy podawania reagentów, które to warunki wynikały z wcześniej przeprowadzonych eksperymentów oraz danych literaturowych. Optymalizacji podlegały m.in. rozmiary otrzymanych nanokapsuł (w pożądanym zakresie od 100 nm do 200 nm) oraz stopień enkapsulacji zamykanych substancji. Najbardziej zadawalające wyniki zostały uzyskane dla kapsuł tworzonych przez kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA) oraz olej Capmul MCMC 10 z uwagi na korzystne oddziaływania z enkapsulowanymi substancjami. W rozdziale 5.3 Doktorant pokazał wykorzystanie otrzymanych nanokapsuł w obrazowaniu komórek wykazując przewagę enkapsulowanych barwników w stosunku do wolnej postaci podawanych komórkom, co związane jest m.in. z lepszym wychwytem nanokapsuł przez komórki. Z uwagi na hydrofobowe środowisko nanokapsuł barwniki wykazują też znacznie mniejszą agregację w porównaniu do wolnych barwników, co przekłada się na wyższą wydajność kwantową fluorescencji i większą czułość obrazowania.

W przypadku nanokapsuł zawierających hydrofobowe kropki kwantowe ($CdSe_xS_{1-x}/ZnS$) oraz ftalocyjaninę cynkową jako fotouczulacz (opisane w rozdziale 5.2.) elementem optymalizacji było także zbadanie wpływu składników nośników na fluorescencję wyżej wymienionych substancji enkapsulowanych, także po dłuższym kontakcie (30 dni). Ten etap znacznie ograniczył wybór zarówno fazy olejowej, jak i polimerów i surfaktantów, a dalsza

optymalizacja procesu emulsyjno-dyfuzyjnego opierała się na doborze odpowiednich stężeń wcześniej wyselekcjonowanych substratów. Otrzymane kapsuły z załadowanymi kropkami kwantowymi zostały poddane m.in. testom fotostabilności w różnych warunkach pH, temperatury, w buforze PBS oraz roztworze ludzkiej albuminy, co jest istotne w przypadku ich zastosowań w bioobrazowaniu. Uzyskane wyniki są bardzo obiecujące, gdyż fluorescencja nieenkapsulowanych kropek kwantowych jest znacznie bardziej wrażliwa na zmienne warunki obecne w różnych miejscach organizmu i organellach komórkowych. W kolejnym etapie przeprowadzono koenkapsulację kolchicyny, hydrofobowego cytostatyku, osiągając bardzo wysokie stopnie enkapsulacji (do 85%). Wyniki pomiarów wskazały również na brak istotnej agregacji nanokapsuł, co jest również bardzo ważną cechą otrzymanych układów teranostycznych. Koenkapsulacja kropek kwantowych oraz fotouczulacza, jakim jest ftalocyjanina cynkowa, doprowadziła do otrzymania kapsuł, w których fluorescencja kropek kwantowych, obecnych nawet w małych ilościach, może być również wykorzystana do śledzenia położenia uczulacza w organizmie. Co bardzo ważne, nanokapsuły z enkapsulowanymi kropkami kwantowymi mogą być również wykorzystane w obrazowaniu przy wzbudzeniu dwufotonowym, tj. w zakresie bliskiej podczerwieni, które to długości fali są znacznie słabiej absorbowane przez tkanki organizmu niż światło widzialne lub ultrafioletowe, co ma znaczenie dla głębokości penetracji wiązki lasera. Doktorant, przy współpracy z grupą Pana prof. Marka Samocia, wykazał, że układy z enkapsulowanymi przez niego kropkami kwantowymi rzeczywiście wykazują fluorescencję przy dwufotonowym wzbudzeniu. Co więcej, pokazane zostało także rezonansowe przeniesienie energii i wzbudzenie cząsteczek fotouczulacza przy zastosowaniu wzbudzenia z zakresu bliskiej podczerwieni nieabsorbowanego przez ftalocyjaninę, co jest m.in. skutkiem bliskich odległości między donorem i akceptorem w niewielkich objętościach nanokapsuł. Efekt ten może mieć również przełożenie aplikacyjne wprowadzając możliwość wzbudzenia w zakresie bliskiej podczerwieni także fotouczulaczy mających niewielki przekrój czynny na absorpcję dwufotonową.

Badania biologiczne (wykonane przez Panią dr inż. Julitę Kulbacką) są zwięźczeniem charakterystyki otrzymanych nanonośników i potwierdzeniem jej potencjału aplikacyjnego. Wyniki tych badań potwierdzają, że nanośniki z enkapsulowanymi kropkami kwantowymi ulegają internalizacji do wnętrza komórek i mogą służyć jako nośniki substancji aktywnych

umożliwiając jednocześnie śledzenie ich lokalizacji przy użyciu fluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska zawiera szereg bardzo wartościowych wyników badawczych wymienionych wyżej, ale z racji roli recenzenta muszę odnieść się także do pewnych uwag polemicznych. (1) W kontekście badanych nowotworowych linii komórkowych pożądane byłoby zbadanie wpływu enkapsulowanych cytostatyków na przeżywalność komórek, a w przypadku pozytywnych wyników także wykonanie badań *in vivo*. Czy takie badania są planowane, a jeśli tak, to jak droga podania nanokapsułów jest rozważana i dlaczego? (2) Na stronie 65 można przeczytać, że próbki przed pomiarami były „przepuszczane przez filtry strzykawkowe z polieterosulfonu”. Jaki był cel tego zabiegu i czy miał on wpływ na wyznaczane rozmiary nanokapsułów? Jaka była wielkość porów w filtrze? (3) Na stronie 76 podana jest szybkość wkrapiania fazy organicznej do wodnej równa 315 $\mu\text{L}/\text{min}$, podczas gdy w tabeli 4.3 jest podane 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. Czy te wielkości dotyczą tego samego procesu? (4) Na stronie 106 podano obniżenie intensywności fluorescencji kropek kwantowych po 30 dniach ich przechowywania w ciemności. Czy zachowane były warunki beztlenowe, a jeśli tak, to jakie może być wyjaśnienie tego zjawiska w przypadku tylko wybranych olejów.

W podsumowaniu mogę stwierdzić, że uzyskane przez doktoranta wyniki prac badawczych przedstawionych w recenzowanej dysertacji niosą istotne wartości poznawcze oraz znaczenie dla projektowania nanoosiłków teranostycznych i ich zastosowań medycznych. Doktorant wykazał się umiejętnością prowadzenia pracy badawczej na wysokim poziomie, krytycznego spojrzenia na uzyskiwane wyniki oraz wyciągania rzetelnych wniosków na ich podstawie. Wykazał się także umiejętnością prowadzenia współpracy naukowej, co jest bardzo cenne w kontekście interdyscyplinarnych prac badawczych, takich jak przedstawione w niniejszej dysertacji. Oceniając pozytywnie recenzowaną pracę stwierdzam, że spełnia ona wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wnoszę, zatem do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, doceniając istotność osiągnięć badawczych Doktoranta, potwierdzone współautorstwem w 5 publikacjach w cenionych czasopismach

naukowych oraz 1 patencie, wysoką jakość przedstawionej dysertacji, wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej Pana mgr inż. Sławomira Jana Drozdka.

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

Szczepan Zapotoczny

Kraków, 25.09.2017