



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Prof. dr hab. inż. Barbara Jachimska,
Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk

Kraków 08.07.2023

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Agaty Żak
pt. „Samoorganizacja bioaktywnych polimerów w środowisku wodnym i ich
oddziaływanie z membranami lipidowymi”**

Przedłożona do recenzji praca doktorska mgr Agaty Żak powstała pod kierunkiem dr. hab. Mariusza Kępczyńskiego w Zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Praca była realizowana w ramach dwóch projektów badawczych, NCN OPUS 11 „Nano i makrostruktury polimerowe powstające w wyniku samoorganizacji kopolimerów blokowych- otrzymywanie i zastosowanie jako nośniki substancji aktywnych” oraz OPUS 18 „Zmodyfikowane glikozaminoglikany jako nanośniki substancji bioaktywnych”.

Z formalnego punktu praca doktorska ma formę klasycznej rozprawy z podziałem na trzy główne rozdziały, poprzedzonych streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wykazem stosowanych skrótów. Każdy rozdział zawiera część teoretyczną, doświadczalną, oraz podsumowanie. Na końcu pracy zamieszczono ogólne podsumowanie rozprawy, wykaz dorobku naukowego oraz bibliografię zawierającą 245 pozycji. Praca została napisana w języku polskim i obejmuje 164 strony w tym 79 rysunków oraz 16 tabel. Pod względem edytorskim praca jest bardzo starannie przygotowana.

Zakres przeprowadzonych badań eksperymentalnych podzielono na trzy części składowe. Pierwsza dotyczy modyfikacji siarczanu chondroityny jako nośnika substancji bioaktywnych, druga oddziaływania amfifilowych pochodnych siarczanu chondroityny z membranami lipidowymi oraz trzecia oddziaływania polikationów z ujemnie naładowanymi membranami lipidowymi.

W pierwszym rozdziale, który obejmuje 58 stron, opisano modyfikację cząsteczki siarczanu chondroityny (CS) przez przyłączenie grup oktadecylowych (CS-C18) lub

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska

tel. +48 12 639 51 01, +48 12 425 19 23

fax +48 12 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego

PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004

NIP: 6750001805, REGON: P-000326351



oleilowych (CS-OL) do łańcucha polisacharydowego. Disacharydowy mer siarczanu chondroityny składa się z kwasu glukuronowego i estru siarczanowego *N*-acetylogalaktozamiiny połączonych wiązaniem β -1,3-glikozydowym. Duża ilość grup reaktywnych w cząsteczce CS pozwala na przyłączenie hydrofobowych związków do hydrofilowego łańcucha polisacharydowego. Stopień podstawienia grupami oktadecylowymi przyjęto na poziomie 1,5%, 6,6% oraz 33%. Otrzymane związki scharakteryzowano stosując metodę dynamicznego rozpraszania światła (DLS), elektroforetycznego rozpraszania światła (ELS), spektroskopii fluorescencyjnej, UV-vis oraz cryo-TEM. Tym samym kontrolowano wielkość promienia hydrodynamicznego, potencjał zeta, krytyczne stężenie micelizacji oraz zmiany morfologii cząsteczek w kontekście stopnia podstawienia grupami hydrofobowymi łańcucha polisacharydowego. Tendencje do tworzenia miceli przez hydrofobowo modyfikowany polimer monitorowano stosując sondę molekularną na bazie 1,6 difenyl-1,3,5-heksatrienu (DPH). Wraz ze wzrostem stopnia podstawienia grupami hydrofobowymi krytyczne stężenie agregacji spada od 49 $\mu\text{g/ml}$ dla CS-C18-1.5% do 17 $\mu\text{g/ml}$ w przypadku CS-C18-33%. Wzrost oddziaływań hydrofobowych wpływa jednocześnie na spadek wielkości promienia hydrodynamicznego cząsteczek oraz wartość potencjału zeta. Potencjał zeta dla wszystkich badanych struktur ma ujemny ładunek pochodzący od grup siarczanowych i grup karboksylowych. Otrzymane struktury polimerowe testowano jako nośnik hydrofobowego leku- kurkuminy. Kurkumina jest substancją pochodzenia naturalnego, która ze względu na jej działanie przeciwzapalne, neuroprotektoryjne, immunomodulujące, antyoksydacyjne i przeciwnowotworowe ma szerokie zastosowania biomedyczne. Kwestie, które znacznie ograniczają skuteczność i użyteczność tego związku, to niska biodostępność wynikająca z trudnej rozpuszczalności w wodzie (hydrofobowy charakter cząsteczki) oraz szybki metabolizm do nieaktywnych metabolitów. Dostępna komercyjnie postać liposomalna kurkuminy cechuje się lepszą przyswajalnością oraz bioaktywnością. Aby zweryfikować potencjał aplikacyjny otrzymanych polimerów określono między innymi wpływ leku na stopień samoorganizacji układu. Dodatek leku tylko nieznacznie wpływa na zmianę krytycznego stężenia agregacji (CAC). Stała wnikanania (K_b) dla kurkuminy do układów opartych na CS jest trzy krotnie wyższe niż w przypadku nanocząstek zbudowanych z amfifilowego kopolimeru blokowego. To wskazuje, że otrzymane układy powinny być skutecznym nośnikiem dla leków o charakterze hydrofobowym. Określono ponadto zdolność



do akumulacji (DLC) oraz enkapsulacji leku (EE). Micele oparte na CS są w stanie akumulować do 20% wagowych leku, a efektywność enkapsulacji jest na poziomie 95%.

Druga część rozdziału poświęcona jest modyfikacji cząsteczek CS grupami oleilowymi. W tym przypadku 10% lub 45% łańcucha polisacharydowego (CS-OL) poddano modyfikacji. Do charakterystyki fizykochemicznej otrzymanych polimerów zastosowano metodologię opracowaną do funkcjonalizacji cząsteczek CS grupami oktadecylowymi. Otrzymany polisacharyd CS-OL10 ulega agregacji przy stężeniu 48 μ g/ml, natomiast CS-OL-45 już przy stężeniu 18 μ g/ml. W obu przypadkach modyfikowane cząsteczki posiadają nieco niższy ładunek ujemny w porównaniu do układów CS-C18. Niezależnie od ilości leku w strukturze, potencjał zeta układu wynosi -19mV. Zdolność do akumulacji kurkuminy jest w tym przypadku niższa i wynosi maksymalnie do 14% wagowych. Efektywność enkapsulacji na porównywalnym poziomie 92- 95%. Dla układów zawierających grupy oleilowe ponadto wyznaczono profil uwalniania kurkuminy z nośnika. W tym celu zastosowano układ dwufazowy składający się z wodnej zawiesiny CS-OL_10 oraz kwasu oleinowego. Ilość uwalnianej kurkuminy monitorowano stosując spektroskopię UV-vis. Uwalnianie kurkuminy z nośnika jest bardzo powolne, 90% leku zostaje uwolniona z nośnika dopiero po 10 dniach. Najistotniejszym osiągnięciem tej części badań jest potwierdzenie, że układy bazujące na siarczanie chondroityny modyfikowanym grupami oleilowymi mają duży potencjał aplikacyjny i mogą stanowić efektywny nośnik dla hydrofobowych substancji aktywnych o przedłużonym uwalnianiu.

Pomimo, że autorka przeanalizowała wyniki w sposób bardzo dokładny i klarowny, poniżej kilka kwestii do dyskusji:

- Autorka nie przedstawiła pomiarów DLS oraz potencjału zeta dla wyjściowego polimeru. Pomiary te stanowiłyby bazę do oceny właściwości fizykochemicznych zmodyfikowanych układów.
- Dla układów CS-OL autorka przedstawiła rozkład wielkości średnicy hydrodynamicznej, z których wynika, że dodatek kurkuminy w zakresie 5-10% wagowych powoduje powstawanie bardziej jednorodnych układów. W przypadku układów CS-C18 brak takiego zestawienia.
- W literaturze stosuje się kilka modeli opisujących proces uwalniania leku z nośników polimerowych. Ze względu na symetrię oraz warunki graniczne, liposomy są bardzo dobrym układem do testowania modeli empirycznych. Ciekawe byłoby zweryfikowanie, jak proces



uwalniania kurkuminy z nośnika na bazie CS-OL_10 różni się od uwalniania z różnego typu macierzy lipidowych, dla których model Higuchiego często określa się jako odpowiedni.

- Na jakiej podstawie ustalono graniczną wartość dodatku kurkuminy w nośnikach opartych na bazie CS-C18 oraz CS-OL odpowiednio na poziomie 20% i 15% wagowych?

Drugi rozdział pracy poświęcono określeniu mechanizmu oddziaływania pochodnych siarczanu chondroityny z membranami lipidowymi. Jako model membrany przyjęto dwuwarstwę zbudowaną z fosfatydylocholiny (POPC). Oddziaływanie materiałów dedykowanych do zastosowań biomedycznych z membraną biologiczną stanowi kluczowy aspekt oceny stopnia ich przydatności. Wpływ amfifilowych pochodnych siarczanu chondroityny na wielkość i ładunek liposomów POPC weryfikowano stosując metodę DLS oraz ELS. Wyjściowe liposomy POPC otrzymane z zastosowaniem ekstrudera ciśnieniowego są bardzo jednorodne (średnica 117 nm, potencjał zeta -3 mV). Dodatek CS prowadzi głównie do zmiany potencjału zeta przy minimalnym zmianie wielkości układów liposomowych. W przypadku hydrofobowych pochodnych CS, sytuacja jest odmienna. Dodatek zarówno CS-C18 jak i CS-OL skutkuje wzrostem efektywnego ładunku układów liposomowych. Największy wpływ obserwuje się dla CS-C18_8 oraz CS-OL_10. Wielkość badanych struktur oraz tendencja do ich agregacji dobrze korelują z morfologią otrzymaną z zastosowaniem cryo-TEM. Oddziaływanie pochodnych siarczanu chondroityny z membraną lipidową monitorowano poprzez enkapsulację kalceiny stosując spektroskopię fluorescencyjną. Zdolność do tworzenia porów w modelowej membranie obserwuje się dla układów o wyższym stopniu podstawienia (CS-C18_33, CS-OL_45). W przypadku CS oraz CS-C18_8 i CS-OL_10 kalceina nie uwalnia się z układów liposomowych, tym samym potwierdza niską przepuszczalność błony. Mechanizm oddziaływania polimerów z membraną lipidową testowano ponadto stosując skaningową kalorymetrię różnicową (DSC) dla układów liposomowych opartych na 1,2-dipalmito-3-sn-glicero-3-fosfocholinie (DPPC). Większe zmiany w obrębie membrany indukują pochodne CS o wyższym stopniu podstawienia zwłaszcza zawierające grupy oktadecylowe. Autorka wykazała ciekawą korelację pomiędzy wzrostem hydrofobowego charakteru zmodyfikowanych polisacharydów a osłabieniem ich oddziaływania z polarnymi głowami lipidów w porównaniu do struktur wyjściowych. Preferencyjne lokowanie się cząsteczki polimeru w hydrofobowej części dwuwarstwy lipidowej wynika ze zmiany właściwości fizykochemicznej związku.



Rozdział trzeci poświęcony jest oddziaływaniu polikationu z ujemnie naładowanymi membranami lipidowymi. W badaniach modelowy polikation stanowił poli[chlorek(3-metakryloiloamino) propylo -trimetyloamoniowy] (PMAPTAC) o stopniu polimeryzacji PMAPTAC₁₆ oraz PMAPTAC₁₄₇. Aby kationowy polimer efektywnie adsorbowały się na powierzchni liposomów ich skład stanowiła mieszanina POPC oraz POPS w stosunku wagowym 1:4. Taki układ posiada potencjał zeta na poziomie -52mV. Cząsteczki PMAPTAC efektywnie adsorbują się na powierzchni liposomu, potwierdza to zmiana potencjału zeta na dodatni. W przypadku zastosowania PMAPTAC₁₆ następuje jednocześnie silna agregacja liposomów. Dla PMAPTAC₁₄₇ agregacja występuje tylko przy niskiej zawartości polimeru w układzie, natomiast wzrost stężenia polimeru stabilizuje układ. Przepuszczalność membrany lipidowej monitorowano poprzez zmianę intensywności fluorescencji kalceiny. Dodatek kationowego polimeru nie powoduje destabilizacji membrany. Dodatkowo, aby określić mechanizm oddziaływania polikationu PMAPTAC z membraną lipidową na poziomie molekularnym przeprowadzono symulacje z zastosowaniem dynamiki molekularnej (MD). Symulacje prowadzono dla cząsteczki polimeru o stopniu polimeryzacji PMAPTAC₂₀ oraz PMAPTAC₄₀. We wszystkich symulacjach dodatkowo naładowana cząsteczka polimeru nieodwracalnie adsorbuje się na ujemnie naładowanej powierzchni membrany POPC/POPS. PMAPTAC na powierzchni membrany przyjmuje bardziej zwartą konformację w porównaniu do formy wyjściowej. Różnice w konformacji łańcucha polimerowego są bardziej widoczne w przypadku krótszego łańcucha polimerowego. Zastosowanie symulacji MD pozwoliło na bardzo precyzyjne określenie, iż adsorpcja PMAPTAC indukuje znaczną reorganizację dwuwarstwy i akumulację anionowych lipidów w pobliżu polikationu.

-Dlaczego do symulacji MD wybrano cząsteczkę PMAPTAC₂₀, a nie jak w badaniach eksperymentalnych PMAPTAC₁₆.

-Na rysunku 76 przedstawiono rozkład długości efektywnej „end to end” cząsteczki PMAPTAC₂₀ oraz PMAPTAC₄₀ w roztworze oraz na powierzchni membrany. Pytanie jaką siłę jonową roztworu przyjęto dla tych symulacji. W opisie mamy wzmiankę o cząsteczkach znajdujących się w wodzie.

W trakcie realizacji badań do rozprawy doktorskiej mgr Agata Żak przeprowadziła rozległe badania eksperymentalne i zastosowała szereg zaawansowanych metod pomiarowych oraz symulacje komputerowe MD. Dane eksperymentalne uzyskane przy użyciu



komplementarnych metod pozwoliły jej na unikatowe określenie lokalizacji cząsteczki CS w obrębie modelowej membrany. Analiza osiągniętych wyników potwierdza, że Doktorantka doskonale opanowała umiejętność posługiwania się zaawansowanymi metodami eksperymentalnymi oraz interpretacji otrzymanych rezultatów. Praca zawiera obszerny warsztat metodologiczny, nowatorskie i cenne wyniki w zakresie projektowania nośników substancji bioaktywnych o dedykowanych właściwościach fizykochemicznych. Podsumowując, Autorka posiada odpowiednią wiedzę i umiejętności do prowadzenia samodzielnych badań naukowych.

Rozprawa zawiera wiele oryginalnych osiągnięć naukowych, które stanowią elementy nowości naukowej. Do najważniejszych z nich zaliczyłabym:

- Strategię zastosowanie hydrofobowej modyfikacji siarczanu chondroityny, która prowadzi do tworzenia struktur zawierających hydrofobowe domeny, w których lokują się cząsteczki aktywne o hydrofobowym charakterze. Układy te charakteryzujące się wysoką efektywnością zarówno pod względem akumulacji jak i enkapsulacji kurkuminy.
- Otrzymane kompleksy oparte na strukturach polisacharydowych z lekiem naturalnego pochodzenia kurkumina, charakteryzują się bardzo długim czasem uwalniania leku w stosunku do typowych struktur liposomowych.
- Zrozumienie i przewidywanie kierunku zmian w obrębie struktur membran biologicznych w wyniku interakcji z nanośnikiem jest jedną z barier rozwoju nanomedycyny. Zastosowanie komplementarnych metod eksperymentalnych i teoretycznych prowadzi do szerszego zrozumienia zarówno mechanizmu adsorpcji jak i określenia orientacji cząsteczki polimerowej na powierzchni membrany. Bazując na wynikach MD możemy śledzić szczegóły reorganizacji struktury membrany lipidowej w wyniku procesu adsorpcji cząsteczki polikationu oraz zweryfikować potencjalny wpływ konformacji łańcucha polimerowego na jej dezintegrację.

Praca napisana jest w sposób zrozumiały dla czytelnika, jednak w tekście zdarzają się nieliczne omyłki, poniżej kilka na które chciałam zwrócić uwagę.

- Sformułowanie „pozostawiono na mieszadle magnetycznym” jest skrótem myślowym.
- W tabelach powinna być adnotacja, dotycząca składu % poszczególnych układów, z wyszczególnieniem, czy dotyczy % wagowego czy objętościowego.



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



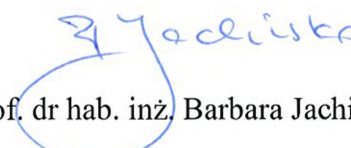
HR EXCELLENCE IN RESEARCH

-Na stronie 79 zdanie zawierające stwierdzenie „tysiące gatunków molekuł”, należałoby przeredagować.

Pani Agata Żak jest współautorką 6 publikacji. Wszystkie prace zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym: Langmuir (IF=4,331), Carbohydrate Polymers (IF=10,723), Journal of Physical Chemistry (IF=3,466), ACS Chemical Neuroscience (IF=5,780), Membranes (IF=4,562), Scientific Reports (IF=4,6). W dwóch publikacjach doktorantka jest pierwszym autorem (H=3). Uczestniczyła w kilku konferencjach, na których zaprezentowała wyniki swoich prac w formie posterów. W trakcie studiów doktoranckich uczestniczyła w 3 projektach badawczych finansowanych przez NCN. Biorąc pod uwagę etap kariery naukowej, dorobek Autorki oceniam na bardzo dobry.

Podsumowując, przedłożona do recenzji praca doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego mającego istotną wartość pod względem poznawczym i aplikacyjnym, a tym samym posiada elementy nowości w zakresie dyscypliny nauki chemiczne. W związku z tym stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Agaty Żak pt. „Samoorganizacja bioaktywnych polimerów w środowisku wodnym i ich oddziaływanie z membranami lipidowymi” spełnia wszelkie wymagania merytoryczne i formalne stawiane pracom doktorskim określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 poz.1668 z późn. zm.). Wobec powyższego wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Agaty Żak do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Ponadto biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy rozprawy doktorskiej, a także znaczący dorobek Pani Agaty Żak wnoszę o wyróżnienie rozprawy przez Radę Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego.


prof. dr hab. inż. Barbara Jachimska

