



Dr hab. Tadeusz Biela prof. CBMiM PAN  
Koordynator Działu Funkcjonalnych  
Polimerów i Materiałów Polimerowych

telefon: +48-42-6803238  
faks: +48-42-6847126  
e-mail: [tadeusz.biela@cbmm.lodz.pl](mailto:tadeusz.biela@cbmm.lodz.pl)

Łódź, 15 sierpnia 2023 r.

## **RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej mgr Aleksandra Forysia**

**pt. „Charakterystyka struktur lipidowo-polimerowych metodami  
obrazowania krio-TEM i dyfrakcji rentgenowskiej SAXS”**

Przesłana do recenzji rozprawa napisana w systemie klasycznym, liczy 126 stron. Złożona jest z kilku części: rozdziału stanowiącego przegląd piśmiennictwa (Przegląd literatury) w pełni związanego z tematem rozprawy, liczącego łącznie ze Streszczeniami w języku polskim i angielskim, Celem i zakresem pracy, 30 str. Praca zawiera Część doświadczalną, wykaz wykorzystywanych materiałów, informację o ich przygotowaniu, opis syntez polimerów i biokoniugatów oraz opis instrumentalnych metod pomiarowych zastosowanych w prowadzonych badaniach. Rozdział ten liczy 10 stron. Kolejna część pracy to rozdział zatytułowany: Wyniki badań i dyskusja wyników oraz kilka niewielkich rozdziałów traktujących o stabilności otrzymanych materiałów, enkapsulacji modelowego leku i jego wpływie na

morfologie otrzymanych struktur oraz wpływ rodzaju użytego kopolimeru na stabilizację otrzymanych zawiesin. Łącznie z podsumowaniem i wnioskami fragment ten obejmuje 47 stron maszynopisu. Rozprawę zamykają spisy: publikacji, których Doktorant jest współautorem (42 artykuły), udziałów w konferencjach polskich i zagranicznych z wystąpieniami ustnymi (13) i prezentacji posterów (13). Pracę zamyka obszerny spis literatury cytowanej, zawierający 194 pozycje oraz jeden załącznik do pracy. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Barbara Trzebicka obecnie dyrektorka CMPW w Zabrze.

Po zapoznaniu się z treścią rozprawy jej ocenę przedstawię w trzech punktach:

- a) Aktualność tematyki badawczej
- b) Zakres pracy i fachowość Doktoranta w doborze i interpretacji metod badawczych
- c) Sposób zredagowania rozprawy

Ad. a) Aktualność tematyki badawczej

Organizujące się w wodzie, stabilizowane przez amfifilowe kopolimery blokowe, struktury lipidowe cieszą się rosnącym zainteresowaniem środowiska naukowego ze względu na szeroki zakres ich zastosowań. Ostatnio badania skupiają się na systemach lipidowych o złożonej, uporządkowanej budowie wewnętrznej. Dotyczy to szczególnie uporządkowanych liotropowych ciekłych kryształów (LLC) oraz liotropowych nanocząstek ciekłokrystalicznych



(LLCNP), takich jak kubosomy i heksosomy. Cząstki te można tak formować, aby kontrolować ich kształt, rozmiar i uporządkowanie wewnętrzne. Ostatecznym celem jest ich stabilność termodynamiczna oraz zdolność do adsorpcji substancji bioaktywnych. Te właściwości nanocząstek pozwalają na potencjalne stosowanie ich, jako nośników substancji hydrofilowych, hydrofobowych oraz amfifilowych. Przedłożona do recenzji praca doktorska dotyczy właśnie badań nad ustaleniem wpływu wybranych amfifilowych kopolimerów blokowych na morfologię, strukturę i stabilność liotropowych nanocząstek ciekłokrystalicznych utworzonych z monooleinianu glicerolu (GMO) stabilizowanego odpowiednimi kopolimerami takimi jak:

poli(tlenek etylenu)-*b*-poli(kwas mlekowy) (PEO-*b*-PLA),

poli(tlenek etylenu)-*b*-poli(5-metylo-5-etyloksykarbonyl-1,3-dioksan-2-one) (PEO-*b*-PMEC),

poli(tlenek etylenu)-*b*-poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PEO-*b*-PCL),

poliglicydol-*b*-poli( $\beta$ -butyrolakton) (PGI-*b*-P( $\beta$ -BL)),

poli(tlenek etylenu)-*b*-poliglicydol-*b*-poli( $\beta$ -butyrolakton) (PEO-*b*-PGI-*b*-P( $\beta$ -BL)).

Zasugerowany przez Doktoranta zakres badań doskonale wpisuje się w szeroko rozumianą tematykę badań w tej dziedzinie, proponując jednocześnie

metodykę oryginalną i nowatorską. Synteza cząstek zbudowanych w kontrolowany sposób z nietoksycznych liotropowych nanocząstek ciekłokrystalicznych utworzonych z monooleinianu glicerolu (GMO) stabilizowanego odpowiednimi kopolimerami, jest stosunkowo łatwa w syntezie. Jest także godna uwagi ze względu na potencjalne możliwości zastosowania tych nanocząstek, jako nośników substancji bioaktywnych. Jak to wynika z przeglądu literatury, podobne układy są dość szeroko stosowane, jako nośniki wielu leków, także przeciwnowotworowych.

Ad. b) Zakres pracy i fachowość Doktoranta w doborze i interpretacji metod badawczych

Zakres przedłożonej pracy jest szeroki i obejmuje syntezę związków wykorzystanych następnie do stabilizacji struktur lipidowych, formowanie stabilizowanych liotropowych nanocząstek ciekłokrystalicznych, aż po enkapsulację modelowego leku (resweratrolu) do wybranych zawiesin lipid-kopolimer. Przeprowadzono pełną charakterystykę zsyntezowanych kopolimerów, potwierdzono ich budowę chemiczną oraz wyznaczono masy molowe i ich dyspersyjność. W tym miejscu należy podkreślić, że najważniejszą techniką wykorzystaną do badania struktur lipidowo-polimerowych była kriogeniczna transmisyjna mikroskopia elektronowa. Ta wyrafinowana technika, wymagająca od badacza wiedzy, wielkich umiejętności manualnych i



doświadczenia, pozwoliła na wizualizację utworzonych cząstek oraz określenie ich uporządkowania poprzez zastosowanie szybkiej transformaty Fouriera. Stosowanie tej metodyki badań dowodzi, że do jej zastosowania nie wystarczy posiadanie odpowiedniej aparatury. Dopiero odpowiednie umiejętności operatora mogą doprowadzić do otrzymania fantastycznej jakości obrazów morfologii badanego materiału.

Do charakterystyki zawiesin stosowano również małokątową dyfrakcję rentgenowską i dynamiczne rozpraszanie światła. Zbadano dziesięć lipidowo-polimerowych hybryd złożonych z monooleinianu glicerolu oraz wcześniej wymienionych kopolimerów. Głównym celem tych badań było znalezienie związku pomiędzy rodzajem i długością hydrofobowego bloku kopolimerów a morfologią powstałych struktur. Jako układy modelowe, zbadano dla porównania zawiesiny lipidu GMO oraz dyspersje GMO stabilizowane przez Pluronic® P407.

W tym celu wykonano badania organizacji liotropowych nanocząstek ciekłokrystalicznych na bazie GMO i różnych kopolimerów w zawieszynie wodnej. Ustalono rodzaj i rozmiar hybryd tworzonych przez kopolimery z monooleinianem glicerolu, a także zbadano stabilność powstałych zawiesin. Wykorzystanie kriogenicznej transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz połączenie tej techniki z małokątową dyfrakcją rentgenowską i dynamicznym rozpraszaniem światła pozwoliło na określenie typu i parametrów cząstek, w

tym rodzaju ich uporządkowania wewnętrznego oraz ustalenie dyspersyjności rozmiarów nanocząstek. Badania potwierdziły, że wszystkie wykorzystane kopolimery amfifilowe tworzyły stabilne zawiesiny lipidowo-polimerowe, a rodzaj i stężenie polimerowego stabilizatora miał istotny wpływ na kształt, rozmiar i typ uporządkowania wewnętrznego uzyskanych cząstek. W zawiesinach obecne były nanocząstki zarówno nieuporządkowane (pęcherzyki, struktury gąbczaste), jak i uporządkowane (kubosomy). Udział tych struktur w populacji nanocząstek zależał od zastosowanego stabilizatora. Rodzaj zastosowanego kopolimeru nie miał natomiast wpływu na grubość dwuwarstwy lipidowej zmierzonej dla pęcherzyków.

Zbadane struktury GMO z amfifilowymi kopolimerami blokowymi zostały porównane z innymi opisanymi w literaturze obiektami tworzącymi się w obecności innych polimerowych stabilizatorów w zawieszynie GMO.

Aby określić możliwości zastosowania powyższych hybryd, jako potencjalnych nośników leków, część zawiesiny LLCNP została użyta do enkapsulacji i zbadania uwalniania substancji biologicznie aktywnej – hydrofobowego resweratrolu, jako modelowego leku. Praca napisana jest przejrzysto i zwięźle. Jasno opisuje wykonane syntezy i formowanie materiałów. Zastosowana metodologia badań nie budzi wątpliwości, a wyniki badań są przedyskutowane i przejrzysto opisane. Nie dopatrzyłem się istotnych błędów merytorycznych. Mniejsze uchybienia opisałem poniżej.



Mam wątpliwości, co do stosowania przez Doktoranta określenia „samoorganizacja” struktur lipidowych, skoro w procesie ich kształtowania uczestniczą amfifilowe kopolimer blokowe i mają ważny wpływ na właściwości nanocząstek. Prosiłbym Doktoranta o przedyskutowanie tego problemu podczas obrony doktoratu.

Dodatkowo warto przedyskutować następujący problem:

Poliglikol etylenowy jest polimerem bardzo szeroko stosowanym w medycynie, farmacji i kosmetyce. Ostatnio okazało się, że ponad 70% ludzkiej populacji ma już przeciwciała przeciwko temu polimerowi. Również Doktorant i cytowana przez niego literatura opisują jego zastosowanie. Z powyższego względu, myślę, że nadchodzi pora na rozpoczęcie poszukiwań alternatywy dla tego polimeru. Oczywiście, ze względu na jego cenę i dostępność, nadal świetnie się nadaje, jako składnik do badań modelowych.

W tym miejscu pozwolę sobie na kilka uwag dotyczących słownictwa stosowanego przez Doktoranta. W pracy doktorskiej słowo „dyspersja” jest używane, w co najmniej w dwóch znaczeniach. Pierwsze dotyczy rozrzutu mas molowych lub/i wielkości cząstek (dyspersyjności  $D$ ), ale także tworzenia zawiesiny cząstek. W obu wypadkach sformułowania są w zasadzie poprawne, ale w tekstach związanych z chemią polimerów mogą prowadzić do nieporozumień. Moim zdaniem, użycie słowa zawiesina, w tym drugim znaczeniu rozwiązuje problem. Jeszcze gorzej jest w wypadku stosowania słowa

„rozkład”, gdy mowa jest o masach molowych. Problem może się pojawić, gdy tekst czytany jest przez osoby niepracujące w chemii polimerów. W terminologii matematycznej wszystko jest w porządku, natomiast rozkład w chemii to też destrukcja, rozpad. Warto o tym pamiętać.

I tak na stronach 58 i 60 znalazłem: przytoczę tylko fragment jednego zdania: .....rozkład mas molowych i dyspersje mas molowych..... Czym się te parametry różnią?

Natomiast na stronie 68 znalazłem:

Współczynnik PDI informujący o dyspersji rozmiarów wynosił 0,25 dla obu dyspersji. Nie jestem pewien, czy wszyscy czytający zrozumieją to zdanie poprawnie.

#### c) Sposób zredagowania rozprawy

Praca zredagowana jest moim zdaniem poprawnie. Proporcje między poszczególnymi rozdziałami są odpowiednie.

(Mam problem z dodaniem załącznika 14 na stronie 124. Moim zdaniem, informacje w nim zawarte mogły być z powodzeniem wkomponowane w główny tekst.)

Wymienię tylko kilka typów błędów, głównie edycyjnych, ale także drobnych merytorycznych.



Strona 12: Największy wpływ na powstanie mezofazy ma temperatura – chyba jednak ciepło (dzule, kalorie nie K czy °C) .... (14) ale na str. 24 Doktorant napisał poprawnie, że degradacja białek jest możliwa pod wpływem ciepła.

Str.10 – powinno być: małokątowa dyfrakcja rentgenowska, nie niskokątowa

Str.23 – dyspersja jest mała nie niska Str. 23 – .....użycie sonifikacji, ultra dźwięków.....? Sformułowania są obok siebie (masło maślane)

Str.27 – późniejsze zastosowanie aplikacyjne (masło maślane)

Str.30 – długi okres czasu – albo długi okres, albo długi czas, niskokątowa dyfrakcja, pod niskimi kątami – powinno być małokątowa, pod małymi kątami

Str. 33 – niska toksyczność – mała toksyczność

Str.56 – jeśli piszemy o masach molowych to podajemy wymiar (g/mol)

Str.57– jeśli ma Pan czystą, wtrąconą próbkę kopolimeru, taką, że może Pan ją dokładnie zważyć, to w ramach liczenia masy molowej przez program Astra, wyznacza on również inkrement  $dn/dc$  kopolimeru bez konieczności analizy składników kopolimerów (ponieważ  $dn/dc$  to suma  $dn/dc$  składników z odpowiednimi ich udziałami w kopolimerze).

Nie wskazuję tutaj na błędy wykonane prawdopodobnie przez edytora Word, polegające na łączeniu przypadkowych wyrazów w jedną całość, szczególnie przy przenoszeniu ich z końca linii do początku następnej. Jest tego dość dużo. Szkoda, że Doktorant je przeoczył i nie poprawił.

Sformułowane powyżej uwagi mają jedynie porządkujące znaczenie i nie wpływają na ogólnie bardzo dobrą ocenę recenzowanej pracy. Chodziło raczej o zwrócenie uwagi Doktoranta na potrzebę krytycznego oglądu przygotowanego tekstu oraz na potrzebę starannej korekty edytorskiej gotowej pracy. Dlatego, w mojej konkluzji końcowej stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszelkie wymagania stawiane przez Ustawę z 13 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym (Dz. U. z 2003r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami), i formułuję wniosek do Rady Naukowej Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych w Zabrze, o przyjęcie pracy doktorskiej i dopuszczenie Pana mgr Aleksandra Forysia do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

