



Dr hab. inż. Przemysław Jodłowski, prof. PK

Kraków, 29.08.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Weroniki Strzempek pt.: „Właściwości wybranych materiałów MOF jako nośników leków”

Praca doktorska mgr Weroniki Strzempek pt.: „Właściwości wybranych materiałów MOF jako nośników leków” została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Gil oraz dr Elżbiety Menaszek.

Praca doktorska przedstawia opis badań prowadzonych na żelazowych sieciach metaloorganicznych z rodziny MIL (*Matériaux de l'Institut Lavoisier*) mających zastosowanie jako nośniki leków w terapii chorób płuc oraz terapii nowotworowej. Tematyka podjętej tematyki badawczej plasuje się obecnie w najnowszych trendach nad opracowaniem nowych biokompatybilnych materiałów mających zastosowanie w medycynie w takich dziedzinach jak transport leków, adsorpcja toksyn czy obrazowanie MRI. Od czasu pierwszych doniesień literaturowych dotyczących sieci metaloorganicznych (ang. *Metal-Organic Frameworks, MOF*) stały się one przedmiotem badań grup naukowców na całym świecie, czego wynikiem jest między innymi ogromna liczba sieci MOF licząca obecnie ponad 100 000 struktur. Oprócz zastosowania sieci MOF do medycyny, znajdują one zastosowanie jako adsorbenty, katalizatory czy sensory. Tak szerokie spektrum możliwych zastosowań powoduje, że sieci metaloorganiczne są obecnie jedną z najszybciej rozwijającą się tematyką badawczą w chemii.

W recenzowanej rozprawie doktorskiej, przedstawione zostały badania nad zastosowaniem sieci MOF jako nośników znanych leków stosowanych w terapii płuc tj. teofiliny, cyprofloksacyny, izoniazydu i pirazydimu oraz leku przeciwnowotworowego – imatynibu, stosując znane sieci MOF typu Fe-MIL-100, Fe-MIL-101 oraz Fe-MIL-101-NH₂. Aby osiągnąć zamierzony cel pracy Doktorantka podjęła kompleksowe studia nad sieciami typu MOF począwszy od zbadania aktualnego stanu wiedzy, poprzez syntezę, modyfikację i charakterystykę opracowanych kompozytów lek@MOF oraz badania nad cytotoksycznością opracowanych materiałów na poszczególne grupy komórek.

Praca doktorska podzielona została na trzy części: przegląd literaturowy, badania nad kompozytami lek@MOF do terapii chorób płuc oraz zastosowanie sieci Fe-MIL jako nośników imatynibu w terapii przeciwnowotworowej.



W pierwszej części rozprawy doktorskiej przedstawiony aktualny stan wiedzy dotyczący budowy i syntezy materiałów typu MOF ze szczególnym uwzględnieniem materiałów typu Fe-MIL-100, Fe-MIL-101 oraz aminopodstawionego Fe-MIL-100-NH₂. Przedstawiono opis aktualnego stanu wiedzy syntezy materiałów typu MOF z zastosowaniem klasycznej metody solwotermalnej, metody mechanochemicznej oraz metody z zastosowaniem mikrofal. Doktorantka przegląda literatury dotyczącej syntezy materiałów typu MOF oparła o artykuły recenzowane z listy JCR z wiodących grup naukowców. Szczególne miejsce w rozdziale pierwszym, zostało poświęcone metodom syntezy materiałów Fe-MIL-100, Fe-MIL-101 oraz Fe-MIL-100-NH₂, ze względu na fakt, że są one wyjściowymi materiałami do otrzymania kompozytów lek@MOF. W przeglądzie opisu syntez, Autorka krytycznie podchodzi do zaprezentowanych metod, poszukując takich, które spełniałyby wysokie wymagania stawiane kompozytom zawierającym lek tj. wysokiej biokompatybilności, niskiej cytotoksyczności oraz zastosowania odczynników spełniających wymagania zielonej chemii. We wszystkich cytowanych metodach syntez, Autorka przedstawia wpływ takich parametrów jak źródło metalu, stopnia utlenienia metalu, stężenie reagentów czy temperatura na parametry strukturalne materiałów.

Znaczna część pierwszego rozdziału pracy została poświęcona bezpieczeństwu stosowania MOF w medycynie oraz możliwość ich zastosowania jako nośniki leków. Autorka w systematyczny sposób opisuje cytotoxiczność zarówno metali tworzących sieć MOF, jak i budujących ją łączników. W tej części pracy przedstawiona została geneza wyboru sieci Fe-MIL-100, Fe-MIL-101 oraz Fe-MIL-100-NH₂ jako nośników leków oraz porównanie właściwości wybranych sieci MOF z innymi materiałami porowatymi typu krzemionki mezoporowate.

Druga część pracy to badania własne, które można podzielić na trzy zasadnicze części: syntezę i charakterystykę wyjściowych materiałów MOF, syntezę i charakterystykę kompozytów teofiliny@MOF, cyprofloksacyny@MOF, pirazynamidu@MOF, izoniazylu@MOF, imatynibu@MOF, badania nad zastosowaniem otrzymanych materiałów do obrazowania metodą rezonansu magnetycznego MRI oraz badań *in vitro*. Rozdziały dotyczące charakterystyki otrzymanych kompozytów lek@MOF obejmują badania z zastosowaniem takich technik jak XRD, FTIR, S_{BET}, SEM oraz w przypadku zastosowania materiałów MOF do relaksometrii i obrazowania MRI – obrazu uzyskane z MR. W rozdziałach tych Autorka konsekwentnie prowadzi czytelnika przez cały proces syntezy kompozytów od momentu enkapsulacji badanego leku, poprzez charakterystykę otrzymanych kompozytów wybranymi metodami po uwalnianie leku. W tym miejscu warto zaznaczyć, że medium, do którego był uwalniany lek jak również sam sposób uwalniania leku był dobierany w zależności od uwalnianego leku w taki sposób, aby symulować parametry najbardziej zbliżone do warunków rzeczywistych. W przypadku leków mających zastosowanie w pulmonologii zastosowano 1% wodny roztwór mydła imitującej występujący w płucach śluz, roztworze Gamble'a czy sztucznym płynie lizosomalnym (teofilina,



cyprofloksacyna, pirazynamid, izoniazyd). Kinytyki uwalniania leków badano w komorach Franza, oznaczając zawartości poszczególnych leków w roztworach stosując metodę spektroskopii UV-Vis. Wyniki badań nad kinytyką uwalniania przedstawione zostały jako profile czasowe dla leku w postaci wolnej oraz z zsyntezowanych kompozytów lek@MOF. Dla każdej z badanych kinytyk uwalniania dopasowane zostały krzywe kinytyczne a wyniki zestawione zostały w tabelach wraz z niezbędną statystyką. Każdy z rozdziałów zawiera zwięzły opis uzyskanych wyników, który wraz z wynikami charakterystyki otrzymanych kompozytów daje informacje na temat miejsca adsorpcji leku oraz dyskusji nad pożądanymi parametrami otrzymanych materiałów tak aby efektywne w potencjalnej terapii. Na uwagę zasługuje sposób charakterystyki otrzymanych kompozytów przy zastosowaniu techniki FTIR oraz dyskusja nad oddziaływaniem lek-struktura MOF. Autorka za każdym razem przedstawia widma czystego leku, wyjściowej sieci MOF oraz otrzymanego kompozytu. W przypadkach, w których możliwe było oddziaływanie roztworów użytych w trakcie impregnacji i tworzenie kompleksów mających wpływ na widmo IR, Autorka wykryzalizowywała lek z roztworu, a następnie wykonywała widmo samego leku. Takie podejście do charakterystyki kompozytów, daje realny obraz struktury uzyskanych materiałów.

Zwieńczeniem prac nad badaniem możliwości zastosowania opracowanych kompozytów w medycynie były badania *in vitro*. Warto podkreślić, że ta część pracy wykracza poza zakres nauk chemicznych, czyniąc pracę doktorską interdyscyplinarną, jak również pokazuje szerokie zainteresowania badawcze Autorki. Badania *in vitro* zostały wykonane przez Doktorantkę w Katedrze Farmakobiologii Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum UJ pod opieką promotora pomocniczego dr Eżbiety Menaszek. Badania *in vitro* przeprowadzono na następujących liniach komórkowych: Calu-3 (HTB-55)-pochodzące z ludzkich gruczołów podśluzówkowych oskrzeli, linii A549 (CCL-185)- składającą się z podstawowych komórek nabłonka pęcherzyków płuc- linii THP-1 oraz w przypadku kompozytów wykazujących aktywność przeciwnowotworową- komórki HL60. Eksperymenty przeprowadzone na liniach komórkowych Calu-3, A549 oraz THP-1 miały na celu określenie wpływu stężenia Fe-MOF jak również stężenia ligandów organicznych na żywotność komórek. W przypadku linii komórkowych Calu-3 oraz A549 Autorka wykazała, że omawiane w pracy materiały Fe-MOF nie wykazują wpływu na metabolizm mitochondrialny i proliferację badanych komórek. W przypadku linii komórkowej THP-1, obniżenie żywotności po podaniu Fe-MIL-101-NH₂ skłoniło Doktorantkę do wykonania dodatkowych eksperymentów mających na celu określenie stężenia reaktywnych form tlenu generowanego przez makrofagi. Wyniki badań przedstawionych w tym rozdziale pracy bez wątpienia posiadają istotną wartość merytoryczną, ze względu na fakt, że dają one odpowiedź na pytanie nad bezpieczeństwem stosowania opracowanych kompozytów i samych materiałów MOF w terapii chorób płuc jak również terapii przeciwnowotworowej. Warto również zauważyć, że kompleksowe podejście do opracowania nowych nośników leków opartych na



MOF jest rzadkością w literaturze, gdyż większość grup badawczy nie posiada tak szerokiego spektrum badawczego jaki został zaprezentowany przez Doktorantkę w niniejszej pracy doktorskiej.

Ostatnią część pracy stanowi opis dorobku naukowego Doktoranta. Wyniki zaprezentowane w niniejszej dysertacji były podstawą publikacji naukowcy opublikowanych w trzech czasopismach takich jak *Microporous Mesoporous Materials*, *Pharmaceutics* czy *Pharmaceutical Research* o sumarycznym współczynniku wpływu Impact Factor wynoszącym **16,981**. Dodatkowo, Pani Weronika Strzempek jest współautorką 7 publikacji z zakresu chemii i inżynierii materiałowej opublikowanych w czołowych czasopismach z listy JCR (*J. Mater. Chem. A*, *Micropor. Mesopor. Mater*) o łącznym IF wynoszącym **46,985**. Oprócz publikacji w czasopismach naukowych, Doktorantka jest również współautorką rozdziałów w trzech monografiach z zakresu medycyny i biologii. W trakcie studiów doktoranckich brała udział w szeregu konferencji naukowych, gdzie 12 razy prezentowała ustnie wyniki badań związanych z tematyką pracy doktorskiej. W trakcie studiów doktoranckich, Pani Weronika Strzempek brała udział również w dwóch projektach OPUS badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, z których liderem jednego z nich była Politechnika Łódzka, natomiast drugiego Uniwersytet Jagielloński. Pomimo znacznego zaangażowania Doktorantki w badania naukowe oraz działalność publikacyjną, posiada również bogate doświadczenia w działalności organizacyjnej, czego świadectwem jest współudział w organizacji szeregu konferencji przeznaczonych dla doktorantów czy studentów Uniwersytetu Jagiellońskiego. Przedstawiony dorobek naukowy, organizacyjny oraz udział w projektach badawczych Pani Weroniki Strzempek jest imponujący.

Praca doktorska mgr Weroniki Strzempek jest przygotowana bardzo starannie co przy rozmiarach rozprawy (192 strony) stanowi nie lada wyzwanie. Przedstawione wykresy są wykonane w czytelny sposób i posiadają zaznaczone najistotniejsze z punktu widzenia czytelnika informacje. W każdym z wykresów dotyczących kinetyki czy wielokrotnych pomiarów, dołączone zostały dane statystyczne, pozwalające określić istotność statystyczną otrzymanych wyników. Przedstawione badania nad zastosowaniem sieci MOF do terapii chorób płuc oraz chorób nowotworowych stanowią wyjściowy materiał do badań *in vivo* a później badań klinicznych. Przedstawiona w pracy metodyka badań dotycząca zastosowania materiałów porowatych jako nośników leków posiada również znaczącą wartość merytoryczną dla osób rozpoczynających badania naukowe z pogranicza chemii i medycyny.

W trakcie lektury rozprawy doktorskiej, powstało szereg kwestii, które z ciekawości recenzenta jak również z chęci poznania metodyki pracy nad materiałami Fe-MOF wymagają wyjaśnienia lub doprecyzowania w trakcie publicznej obrony pracy. Pytania te mają jedynie za zadanie pobudzić dyskusję nad wynikami badań i nie mają wpływu na moją wysoką ocenę merytoryczną pracy.



Szczegółowe pytania lub komentarze zamieszczone są poniżej.

- idąc w ślad za stwierdzeniem na str. 13 „Przebieg syntezy materiałów MOF jest często bardzo wrażliwy na nawet niewielkie zmiany składu mieszaniny reakcyjnej lub temperatury; okazuje się, że odtworzenie procedury opisanej w literaturze jest trudne.” w jaki sposób Doktorantka kontrolowała parametry sieci MOF typu S_{BET} , V_p , rozkład porów oraz wielkość ziaren? W pracy przedstawione są wyniki niskotemperaturowej sorpcji dla syntez zmodyfikowanych przed Doktorantką. Czy materiały MOF syntezowane były raz i ilość ta była wystarczająca do wykonania wszystkich pomiarów czy przeprowadzono wiele syntez a parametry materiałów były kontrolowane na bieżąco?
- w części teoretycznej pracy zabrakło dyskusji nad występowaniem defektów strukturalnych w sieciach MOF, które mają istotny wpływ na późniejszą enkapsulację leków jak również kinetykę desorpcji leku.
- Czy wielkość ziaren otrzymanych materiałów była w przypadku syntez wielokrotnych zbliżona? Zmienna wielkość ziaren wpływa na współczynnik efektywności ziarna jak również różne parametry dyfuzji leków ze struktury otrzymanych kompozytów.
- proszę o wyjaśnienie zdania str. 64 „..., które mogą pochodzić od defektowego, sprostowanego kwasu tereftalowego” oraz wyjaśnienie występowanie drgań deformacyjnych OH pochodzących od kwasu tereftalowego w otrzymanej sieci MOF. Czy występowanie tych drgań sugeruje niekompletne wypłukanie nieprzereagowanego kwasu tereftalowego?
- w wynikach niskotemperaturowej sorpcji azotu zabrakło wykresów opisujących rozkład porów. Zaprezentowanie krzywych rozkładu porów pozwoliłoby na dokładne określenie porów w otrzymanych sieciach MOF oraz uwidoczniłoby występowanie defektów strukturalnych, o których pisze Doktorantka w pracy doktorskiej,
- z przedstawionych badań wynika, że opracowane materiały charakteryzują się niską cytotoksycznością (żywołność komórek ponad 85%), niemniej jednak czy wyznaczone zostały wartości LD50, które pozwoliłyby na porównanie z innymi sieciami MOF np. UiO-66 czy NU-1000?
- czy Doktorantka symulowała występowanie defektów strukturalnych w otrzymanych strukturach typu brak węzła, brak linkera, brak węzła i linkera oraz wpływ defektów strukturalnych na dyfraktogram? Analiza tego typu pozwoliłaby na znalezienie różnic pomiędzy opracowanymi materiałami ze względu na sposób preparatyki oraz na dyskusję miejsca adsorpcji enkapsulowanych leków w sieciach MOF,



- jakie stosowano warunki suszenia otrzymanych MOF w przypadku Fe-MIL-101 oraz Fe-MIL-101-NH₂? Czy próbki suszono w atmosferze powietrza czy próżni?
- pomimo, że Doktorantka każdy z rozdziałów kończy podsumowaniem, w pracy zabrakło rozdziału sumarycznego podsumowania opisującego najważniejsze wyniki jak również osiągnięcia pracy,
- na wykresach 2.46, 2.47, 2.48, 2.49, 2.50 nie podpisano wykresów pozwalających na określenie dla jakich próbek zostały wykonane pomiary,
- na Rysunku 2.3 nie przedstawiono słupków błędów,
- na rysunku 2.68 powinno być Fe-MIL-101-NH₂ zamiast FeMIL101NH2, analogicznie Fe-MIL-100 zamiast FeMIL100
- na wykresach izoterm adsorpcji azotu nie podpisano osi rzędnych w przypadku występowania wykresów a oraz b,
- w pracy doktorskiej zabrakło listy zastosowanych skrótów,
- czy skrót DBC oznacza to samo co BDC?
- równania reakcji jak również wzory zastosowane do obliczeń nie zostały ponumerowane,
- część wykresów zaczerpniętych z literatury jest mało czytelna (np. Rys. 1.6., 1.9.),

W recenzowanej pracy występują nieliczne błędy edytorskie, gramatyczne oraz interpunkcyjne, jednakże nie mają one wpływu na wysoką wartość merytoryczną pracy.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Weroniki Strzempek pt.: „Właściwości wybranych materiałów MOF jako nośników leków” stanowi kompendium wiedzy nad syntezą i modyfikacją MOF do zastosowania jako nośników leków, począwszy od poszukiwania odpowiedniego nośnika porowatego, jego syntezę i charakterystykę fizykochemiczną, otrzymane kompozytu lek@MOF, badania kinetyki uwalniania leku oraz szczegółowe badania *in vitro*. Przedstawione wyniki badań dostarczają szczegółowych informacji na temat otrzymywania kompozytów lek@MOF do zastosowania w terapii chorób płuc oraz terapii przeciwnowotworowej. Uzyskane wyniki badań nad opracowanymi kompozytami lek@MOF mogą stanowić punkt wyjścia do badań *in vivo*. Rezultaty prac mają znaczący wkład w rozwój badań nad zastosowaniem sieci metaloorganicznych do zastosowań w medycynie.

Opiniowana praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. 2018 poz. 1668) i na tej podstawie wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Weroniki Strzempek do



publicznej obrony rozprawy doktorskiej. Jednocześnie, biorąc pod uwagę znaczący wkład merytoryczny pracy w rozwój dyscypliny, bogaty materiał badawczy, mnogość zastosowanych technik badawczych oraz interdyscyplinarność pracy, składam wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Przemysław Jędrabek