Politechnika Wrocławska

Politechnika Wrocławska
Wydział Chemiczny

Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
https://wch.pwr.edu.pl

Wrocław, 30.05.2022

Prof. dr hab. inż. Kazimiera A. Wilk
e-mail: kazimiera.wilk@pwr.edu.pl
tel. +48 696 613 668

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marii Zatorskiej-Płachty
pt. *Zamykanie substancji bioaktywnych w mikro- i nanostrukturach polimerowych*
Promotor: dr. hab. Mariusz Kępczyński, prof. uczelni

WPROWADZENIE

Opracowywanie innowacyjnych systemów dostarczania leków (ang. *Drug Delivery Systems*, DDS) jest obecnie przedmiotem zainteresowania szeregu renomowanych ośrodków badawczych na świecie. Systemy te projektuje się zgodnie z przyjętymi kryteriami, by dany nośnik stanowił skuteczną ochronę substancji aktywnej przed degradacją i zapewnił jej zadaną pojemność załadunkową dla wymaganej biodystrybucji w tkankach docelowych. Dodatkowo oczekuje się, by DDS o skali mikro- lub nanometrycznej dostarczał substancję aktywną w sposób kontrolowany i z wykluczeniem przedwczesnego jej uwalniania. Dodatkowo wymogiem jest, by nośnik był biokompatybilny (tutaj głównie: bez wywoływania odpowiedzi immunologicznej i negatywnych skutków stosowania) i biodegradowalny (tutaj: po zakończeniu działania terapeutycznego, by nośnik ulegał rozkładowi pod wpływem czynników fizjologicznych/enzymatycznych do substancji nietoksycznych). Tematyka pracy doktorskiej mgr Marii Zatorskiej-Płachty, dotycząca badań nad procesami enkapsulacji wybranych leków modelowych w polimerowych mikro- i nanonośnikach, dokładnie wpisuje się w wyżej zasygnalizowany obszar aktywności naukowej.

Mgr Maria Zatorska-Płachta wykonała swoją pracę doktorską pod kierunkiem dr. hab. Mariusza Kępczyńskiego, prof. ucz., w Zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii, na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Jako pokłosie zaangażowania badawczego, Doktorantka jest współautorem 7 artykułów z listy JCR, z czego 2 (*Int. J. Pharm.* i *ACS Omega* – dotyczą zakresu pracy doktorskiej, a także 14 komunikatów konferencyjnych, w tym 6 – na międzynarodowych. Część materiału jest w przygotowaniu do wysłania do redakcji. Recenzowana praca doktorska została wykonana zarówno w ramach grantu NCN (OPUS 11, nr DEC-2016/21/B/ST5/00250), jak i dotacji dodatkowych.

OPINIA MERYTORYCZNA

Materia treściowa rozprawy obejmuje 170 stron i jej zamysł kompozycyjny składa się z tradycyjnego wstępu teoretycznego oraz czterech integralnych części eksperymentalnych, starannie omówionych proceduralnie, dobrze umotywowanych i zinterpretowanych. Bardzo bogata bibliografia obejmuje 214 pozycji anglojęzycznej światowej literatury. Źródła literaturowe stanowią merytorycznie uzasadnioną dokumentację działań naukowo-badawczych podjętych przez Doktorantkę. W części teoretycznej pracy Autorka w sposób kompetentny dokonała opisu zagadnień, związanych ze stanem wiedzy na temat: (i) polimerów i ich zastosowań; (ii) budowy i specyfiki wybranych polimerowych nośników leków (tutaj: micele polimerowe, polimerosomy, poligonowe pęcherzyki, koacerwaty i kompleksy polielektrolitowe oraz mikrosfery polimerowe); (iii) cech enkapsułowanych substancji bioaktywnych. Część literaturowa dowodzi dobrej znajomości omawianych zagadnień przez Autorkę.

Głównym celem recenzowanej pracy doktorskiej była ocena efektywności enkapsulacji wyselekcjowanych czynników aktywnych typu kropki kwantowe, enzym inwertaza, celekoksyb lub kurkumina, w strukturach polimerowych o rozmiarach mikro- i nanometrycznych. Składniki budulcowe struktur polimerowych stanowiły pary polielektrolitów (polijonów) obdarzonych przeciwnymi ładunkami, homopolimery, a także amfifilowe kopolimery blokowe. Koncepcja recenzowanej dysertacji oparta jest na następującym założeniu: zaprojektowanie i wytworzenie efektywnego nośnika polimerowego jest działaniem zindywidualizowanym dla układu: polimer-lek, wymagającym określenia wpływu szeregu parametrów natury strukturalnej i termodynamicznej na proces zamykania w strukturach nośnika, a następnie uwalniania w wymaganym miejscu działania. I stosownie do tak ustawionego wektora badawczego, Doktorantka skupiła się zarówno na kompleksowej charakterystyce fizykochemicznej zaprojektowanych mikro- i nanoukładów, jak i na opracowaniu najefektywniejszej procedury enkapsułowania w nich modelowych terapeutyków/czynników diagnostycznych. W szczególności podstawowymi elementami oceny były: analiza rozmiarów i morfologia nośników, ocena zmiany hydrofobowości bloku budulcowego, ocena stabilności koloidalnej i kinetyki uwalniania leku *in vitro* a często i wyznaczenie parametrów termodynamicznych oddziaływań pomiędzy komponentami nanoukładu czy stałej równowagi procesu wnikania leku. Na szczególną uwagę zasługują badania dystrybucji przestrzennej substancji aktywnej w mikrocząstkach, które pozwalają wyjaśnić problem z obserwowaną w literaturze niską efektywnością enkapsulacji.

Poniżej opisane układy były przedmiotem kompleksowej oceny Doktorantki w odniesieniu do wyżej opisanych celów szczegółowych:

1. Mikrocząstki koacerwatowane wytwarzane poprzez połączenie wodnych roztworów przeciwnie naładowanych polimerów, takich, jak: poli(chlorek (3-(metakryloiloamino)propylo)-trimetyloamoniowy (PMAPTAC) i poli(2-(akryloamido)-2-metylopropanosulfonian sodu) (PAMPS) o różnych długościach łańcucha polimerowego: PMAPTAC16/PAMPS18, PMAPTAC147/PAMPS142 oraz para kopolimerów z blokiem poli(glikolu etylenowego) (PEG): PEG14-PMAPTAC154/PEG14-PAMPS153. W otrzymanych mikrocząstkach enkapsułowano najpierw kropki kwantowe (QDs) funkcjonalizowane grupami karboksylowymi, ze względu na ich potencjał jako znaczniki fluoroscencyjne. W omawianych mikrostrukturach

polimerowych immobilizowany był również enzym – inwertaza, katalizujący reakcję hydrolizy sacharozy do glukozy oraz fruktozy.

2. Nanocząstki polimerowe (zwane przez Doktorantkę nanostrukturami), zbudowane z amfifilowych kopolimerów blokowych (PEG-PLGA oraz PEG-PLLA), których ugrupowania hydrofobowe, pozyskuje się z odnawialnej bazy surowcowej (tj., poli(L-laktyd) (PLLA) lub poli(laktyd-*ko*-glikolid) (PLGA)), zaś syntetyczny poli(glikol etylenowy) to ugrupowanie hydrofilowe. Powyższe nanonośniki, otrzymane za pomocą metody wymiany rozpuszczalnika, wykorzystano do enkapsulacji celekoksybu (CEL) - niesteroidowego leku przeciwzapalnego i przeciwbólowego, trudno rozpuszczalnego w wodzie.
3. Nano- i mikrocząstki, wytwarzane za pomocą techniki wymiany rozpuszczalnika, zbudowane z dwóch typów kopolimerów: poli(2-(metakryloilooksy)-etylofosforylocholina)-*b*-poli(D,L-laktyd) (PMPC-PDLLA) lub polistyren-*b*-poli(kwas akrylowy) (PS-PAA). W ww. nośnikach na etapie ich wytwarzania, enkapsułowano kurkuminę (CUR), hydrofobowy fitofarmaceutyk o działaniu przeciwbakteryjnym oraz przeciwnowotworowym.

Przechodząc do oceny wyników, uzyskanych przez Doktorantkę, należy podkreślić ogromny wkład pracy wymagającej szczególnej skrupulatności i zachowania dyscypliny badawczej. Zrealizowanie założonych ambitnych planów naukowo-badawczych uznaję za sukces Doktorantki. W mojej ocenie szczególnymi atutami pracy mgr Marii Zatorskiej-Płachty są następujące wyróżniki:

1. Zgodnie z literaturą przedmiotu recenzowana praca doktorska ma elementy nowości naukowej. Kluczowe wyniki, stanowiące odniesienie do celu i zakresu pracy, zostały w części opublikowane w czasopismach naukowych JCR (o czym jest wzmianka we wstępie recenzji). . Osiągnięcia Autorki są cenne w świetle nowego wkładu do literatury przedmiotu i godne podkreślenia.
2. Doktorantka udowodniła, że do enkapsułowania kropek kwantowych oraz immobilizowania inwertazy najbardziej dogodne są mikrocząstki koacerwatowane z PMAPTAC147 i PAMPS142 ze względu na największą stabilność. Procedura przygotowania bez użycia rozpuszczalników organicznych oraz dobra wydajność procesu enkapsulacji substancji aktywnych są atutem w różnych aspektach – przy stosowaniu układów jako modeli oddziaływań pomiędzy polielektrolitami obdarzonymi przeciwnymi ładunkami, jako nośniki w nanoteranostyce czy w naukach biomedycznych.
3. W odniesieniu do zamykania celekoksybu w polimerowych nanocząstkach PEG-PLGA oraz PEG-PLLA badania wykazały, że kluczową rolę w usprawnianiu procesu odgrywają oddziaływania pomiędzy lekiem a polimerem; samo zwiększenie długości bloku hydrofobowego wykorzystywanego kopolimeru nie daje satysfakcjonujących wyników. Dzięki badaniom, wykorzystującym reakcję enzymatyczną katalizowaną przez cyklooksygenazę 2, Doktorantka udowodniła, że proces enkapsulacji celekoksybu w hydrofobowym środowisku mikroheterogenicznym nie obniża jego aktywności terapetycznej, co może okazać się przydatne dla potencjalnych zastosowań biomedycznych z użyciem CEL.
4. Nanocząstki zarówno kopolimeru PMPC-PDLLA, jak i PS-PAA mogą stanowić dogodne nanonośniki dla kurkuminy; pozwalają na efektywną jej enkapsulację w niszach hydrofobowych, a sposób ich wytwarzania nie wymaga zastosowania toksycznych

rozpuszczalników organicznych. Te rozdziały dysertacji uważam za najbardziej interesujące doniesienia. Wyniki eksperymentalne dodatkowo zostały potwierdzone symulacjami metodą dynamiki molekularnej dla układów modelowych zawierających CUR oraz PS lub PDLLA. W przypadku PDLLA kurkumina umiejscawia się głównie na peryferyjnych fragmentach struktury nośnika, podczas gdy w PS jest ona rozłożona bardziej równomiernie w całej jego objętości.

5. Doktorantka w swoich eksperymentach stosowała prawidłową metodologię badawczą – przykładowo są to: dynamiczne rozpraszanie światła (ang. *Dynamic Light Scattering*, DLS), mikroskopia sił atomowych (ang. *Atomic Force Microscopy*, AFM), kriogeniczna transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang., *Cryogenic Transmission Electron Microscopy*, cryo-TEM), spekrofotometria, spektrofluorymetria, konfokalna laserowa mikroskopia skaningowa (ang. *Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM), mikroskopia optyczna, mikroskopia kąta Brewstera (ang. *Brewster Angle Microscopy*, BAM), izotermiczna kalorymetria titracyjna (ang, *Isothermal Titration Calorimetry*, ITC), a także turbidymetria. Procedury syntetyczne, metody analityczne i techniki obliczeniowe są wybrane prawidłowo i zgodnie z aktualna wiedzą.

Opisane powyżej badania mają charakter studiów interdyscyplinarnych, wymagających od Doktorantki dobrego przygotowania i wiedzy z zakresu kilku gałęzi chemii. Należy podkreślić, że opanowała Ona w bardzo dobrym stopniu zarówno podstawy fizykochemiczne, jak i uzyskała kompetencje instrumentalne, umożliwiające prawidłowy dobór i wykonanie procedur syntetycznych i analitycznych, a także interpretację wyników.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na pewne istotne wątki w pracy, które warto mieć na uwadze w przyszłych badaniach. Poniżej wykaz pytań (*stricte* o charakterze dyskusyjnym), wobec których oczekuję ustosunkowania się przez Doktorantkę w trakcie obrony:

- Czym różni się kompatybilność chemiczna od biologicznej nośników terapeutyków?
- Doktorantka często używa ogólne formy, typu „nano- lub mikrostruktury polimerowe", na określenie otrzymanego nośnika i często nie ma w rozdziale ich nazwy jednoznacznej. Jakie dokładnie typy nośników leków były przedmiotem badań Doktorantki w Rozdziałach I, II, II i IV - jako wynik budowy amfipatycznej stosowanych polimerowych bloków budulcowych?
- Czy w oparciu o uzyskane wyniki można opracować zbiór wytycznych, tj., materiału w rodzaju algorytmów postępowania, umożliwiających wytworzenie dogodnego nośnika dla danej substancji i zadanej dolegliwości/choroby?

WNIOSEK KOŃCOWY

W podsumowaniu stwierdzam, że praca doktorska mgr Marii Zatorskiej-Płachty całkowicie spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim (w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kazimierz A. Wilk