



10-05-2016, Warszawa.

Recenzja rozprawy doktorskiej
Magister inż. Katarzyny Krukiewicz

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Krukiewicz p.t. „Polimery skoniugowane jako matryce w systemach kontrolowanego uwalniania związków biologicznie aktywnych” została wykonana na Wydziale Chemicznym w Katedrze Fizykochemii i Technologii Polimerów Politechniki Śląskiej pod kierunkiem dr hab. inż. Jerzego Żaka, prof. PŚ.

Celem pracy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Krukiewicz było wykorzystanie polimerów przewodzących, jako nowego typu materiałów do unieruchamiania leków i opracowanie optymalnego sposobu wprowadzania leku oraz jego uwalniania. Tematyka nośników leków to bardzo „gorący” temat w chemii medycznej ze względu na liczne toksyczne efekty wielu leków i ich niekorzystny wpływ na zdrowe komórki, zamiast tylko na te chore i wymagające terapii. Gama testowanych obecnie nośników jest szeroka – wszystkie mają zalety, ale i wady. Wśród nich proponowane materiały polimerowe mogłyby być bardzo interesującym rozwiązaniem. Tematyka pracy jest więc aktualna i ważna.

Praca składa się 30-stronicowego wprowadzenia, w ramach którego sformułowano cele pracy, opisano polimery skoniugowane jako nośniki substancji biologicznie aktywnych, podano metody eksperymentalne pracy oraz przedstawiono wyniki i je przedyskutowano. Na 4 stronach zebrano odnośniki literaturowe i na koniec załączono 6 publikacji, które są podstawą pracy doktorskiej. Na początku pracy umieszczono wykaz tych publikacji i Autorka określiła swój w każdej z nich, a także zamieściła spis 7 publikacji nieujętych w pracy doktorskiej i podała stosowane skróty.

We wstępie Doktorantka opisała krótko wybrane nośniki leków i problemy z kontrolowaniem uwalniania leku. Brakuje trochę podkreślenia wagi adresowania nośników do odpowiednich komórek, a przecież wiele prób podejmowanych jest właśnie w tym kierunku. Jako cel pracy Autorka wybrała opracowanie optymalnych procedur otrzymania nośnika z polimeru skoniugowanego. Jonowymienne właściwości tych polimerów (polipirolu, PEDOTu, PEDOPu) omawia dokładniej, gdyż są ważne w kontekście wiązania leków obdarzonych ładunkiem. We wstępie zabrakło mi charakterystyki leków i uzasadnienia wyboru leków (ibuprofenu, cyprofloksacyny, kwercetyny, kwasu oleanolowego) tzn., na czym polega ich toksyczność i dlaczego właściwie mają być podawane w formie nośnikowej. Kieruje się dopasowaniem leku do konkretnej matrycy polimerowej traktując lek właściwie jako próbnik właściwości matrycy, a nie jako substancję, która jest najważniejsza, ponieważ ma być podawana do organizmu żywego.

W części 4, poświęconej metodom eksperymentalnym, Doktorantka charakteryzuje voltamperometrię cykliczną i jej przydatność do oceny oddziaływań leku z matrycą. Ponieważ polimer jest unieruchomiony na elektrodzie, można całkując prąd z voltamogramów, wyznaczyć ładunek, na podstawie którego, Autorka określa parametr pojemności jonowej różnych matryc – CSC. Jest to dobry parametr do określenia właściwości matrycy polimerowej oraz jej stabilności na podłożu elektrodowym, ale nie mówi wiele o samym leku – jego zakotwiczeniu, czy stopniu zagregowania w matrycy. Jest on też niespecyficzny i nie mówi czy to lek czy inny jon został wbudowany lub uwolniony z matrycy. Gdyby lek był elektroaktywny to taka informacja byłaby także dostępna.

Zespół zastosowanych metod badawczych jest obszerny: spektroskopia UV Vis, Ramana, mikroskopia elektronowa z EDS oraz elektrochemiczna mikrowaga kwarcowa, ale nie są one stosowane we wszystkich pracach jednocześnie.

W rozdziale 5 Autorka dyskutuje wyniki swoich badań. Omawiając tę część będę, dodawała moje komentarze do samych prac, których kopie załączone są w końcowej części dysertacji.

Istotnym osiągnięciem doktoratu jest opracowanie dwu metod tworzenia matrycy z unieruchomionym lekiem. Metoda jednoetapowa, to inaczej osadzanie leku *in situ*, czyli jednocześnie z polimeryzacją monomeru, przy użyciu wielokrotnego przemieszczania

potencjału w cyklicznej woltamperometrii. To rozwiązanie jest najprostsze, jednak w większości stosowanych leków i polimerów daje gorsze wyniki i Autorka słusznie wiąże ten fakt z konkurencją o miejsca z anionami obecnymi w nadmiarze w roztworze. Wbudowywanie leków anionowych, co Autorka pokazuje na przykładzie ibuprofenu następuje przy dodatnich potencjałach, które grożą jednak degradacją niektórych polimerów. Stosowanie równoległe obu metod do porównania efektywności unieruchamiania leku w matrycy uważam za bardzo słuszne, tym bardziej, że dla leków w formie obojętnej, o innych zasadach wbudowywania się w matrycę, podejście *in situ* może okazać się dobrym rozwiązaniem. Kwercetyna jest przykładem takiego obojętnego leku, a przy tym elektroaktywnego. Pokazany w pracy 2 sygnał elektrootlenienia tego flawonoidu można było także wykorzystać do analizy stężenia leku w matrycy i czasowych zależności jego uwalniania do roztworu.

Metoda trój etapowa, inaczej *ex situ*, polega na rozdzieleniu procesu polimeryzacji i unieruchamiania leku i jest skuteczna dla leków w formie anionowej i wszystkich zastosowanych polimerów. Jej opis w każdej publikacji jest bardzo szczegółowy, a porównanie wyników przekonuje, że Autorka znalazła skuteczny sposób unieruchamiania leków w matrycach polimerowych. Wyznaczone wartości pojemności potwierdzają wybór tej metody, jako wygodnego sposobu przygotowania warstwy nośnikowej. Zastosowanie w pracach 4 i 6 spektroskopii ramanowskiej oraz mikroskopii elektronowej SEM z EDS potwierdza obecność leku w matrycy. Odejście w późniejszych pracach od elektrolitu LiClO_4 na rzecz chlorków jest jak sądzę podyktowane efektywniejszym zastępowaniem chlorków w matrycy przez lek na drodze wymiany jonowej. Obrazy mikroskopowe pokazały także zmiany morfologii warstw po związaniu leku oraz czasem krystalizację powierzchniową leku, co nie jest chyba korzystne w przypadku nośników leków.

Istotną częścią pracy są badania uwalniania leków zakotwiczonych w matrycy, gdyż w niektórych przypadkach wyraźnie widać, że lek można wydajniej usunąć po przyłożeniu ujemnego potencjału do elektrody pokrytej warstwą polimeru z lekiem. Pytanie, jak zrealizować to włączenie uwalniania w organizmie, pozostaje w pracy bez odpowiedzi, chociaż czytelnik bardzo oczekuje, choćby pomysłów na ten temat w publikacjach stanowiących doktorat. Ilość uwolnionego leku Autorka wyznacza metodą mikrowagi kwarcowej lub analizy roztworu przy elektrodzie metodą spektroskopii UV-Vis.

Problemem do rozwiązania jest zmniejszenie udziału spontanicznego uwalniania, czyli desorpcji leku bez przyłożenia potencjału odpowiadającego redukcji polimeru. W niektórych przypadkach Autorka znalazła sposób na zmniejszenie tego udziału poprzez kondycjonowanie matrycy przez określony czas przy otwartym obwodzie – wtedy powierzchniowo i luźno zaadsorbowany lek jest usuwany spontanicznie, a związany elektrostatycznie i głębiej w matrycy, usuwany jest po przyłożeniu odpowiedniego potencjału. Brakuje tylko bardziej ilościowego podejścia do procesu wymywania – z analizy zależności czasowych i stężeniowych badacze nośników leków wyznaczają czas połowicznego uwalniania leku oraz określają model wymywania leku z matrycy. Rozumiem, że są to badania do wykonania w przyszłości. Również zależności pojemności od grubości warstwy są potraktowane raczej jakościowo – brakuje w każdym przypadku wyznaczania grubości warstwy – wskazania grubości optymalnej dla danego stężenia leku w roztworze. Grubość warstwy, a nie tylko optymalna liczba cykli voltametrycznych to ważna informacja dla korzystających z proponowanej przez Autorkę metody wiązania/uwalniania leku. W przypadku nośników leków mniejsze znaczenie ma możliwość wielokrotnego wiązania /uwalniania, które Autorka analizuje w rozdziale 5.6. Ważniejsze jest zagadnienie jak doprowadzić do kontrolowanego uwolnienia leku tam, gdzie jest miejsce jego przeznaczenia, czyli w chorej komórce. Jak zrealizować proces redukcji polimeru uwalniającej lek. Warto także pamiętać, że w przypadku uwalniania leków w terapii nowotworowej – środowisko komórek nowotworowych ma niższe pH niż zdrowych. W pracy brakuje więc analizy procesu potencjałowego uwalniania leków z matrycy do roztworów o różnych pH. Zmiana pH pomiędzy 5,4 (komórki chore) i 7,5 (komórki zdrowe) może sprzyjać poprawie stosunku ilości leku uwalnianego na drodze potencjałowo włączanej do ilości uwalniającej się spontanicznie. Wpływ pH powinien być równie istotny dla cyprofloksacyny, gdyż w warunkach badania jest jonem obojnaczym, ale poniżej pH 6,09 jest dodatni, a powyżej 8,74 - ujemny, więc w stosunkowo wąskim zakresie pH właściwości i zdolność do oddziaływania z matrycą polimerową będą się znacznie zmieniać.

Badania biologiczne, które już pokazały, że ibuprofen po uwolnieniu z matrycy nie zmienia właściwości, muszą wykazać korzyści płynące z zastosowania nośnika polimerowego w stosunku do wprowadzania leku bez nośnika. W szczególności dotyczy to nowego nośnika leku, jakim jest matryca PEDOP.

Praca mgr Krukiewicz jest bardzo porządnie przygotowana i nie znalazłam w niej większych błędów edytorskich, pozostało trochę sformułowań chemicznych kalkowanych z języka angielskiego, ale to zdarza się wszystkim autorom.

Rezultaty zebrane w pracy doktorskiej dobrze pokazują, że mgr Katarzyna Krukiewicz otwiera swoimi badaniami nową drogę zastosowaniom polimerów przewodzących, umożliwiając jednocześnie ocenę przydatności wybranych polimerów jako materiału do unieruchamiania i uwalniania leków. Możliwości potencjałowego włączania procesu uwalniania leku rozpatrywane są w sposób rzeczowy i niepozbawiony elementów krytycznych. Jest to poważny wkład naukowy, choć jeszcze nie pokazano jak zrealizować przełączanie w warunkach organizmu ludzkiego (w nośnikach czy implantowanych urządzeniach dostarczania leków). Rzetelna praca przeglądowa, dobrze odzwierciedlająca stan wiedzy na temat układów przenoszenia leków (praca Nr. 5, w Bioelectrochemistry) pozwala przewidywać, że aspekty medyczne zastosowań polimerów przewodzących staną się teraz głównym punktem zainteresowania Autorki.

Pani mgr inż. Katarzyny Krukiewicz jest współautorką 13 publikacji w bardzo dobrych czasopismach naukowych, z których 6 stanowi pracę doktorską.

W oparciu o przeprowadzoną analizę rozprawy stwierdzam, że praca mgr inż. Katarzyny Krukiewicz spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim przez Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym i wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Uważam, że jest to wartościowy wkład w dziedzinie nowych materiałów do wykorzystania jako nośniki leków. Duży i nowatorski dorobek Autorki uzyskany w ramach pracy doktorskiej skłoniło mnie również do wystąpienia o jej wyróżnienie.


Renata Bilewicz