

Prof. dr hab. inż. Ewa Schab-Balcerzak

Zabrze, 25.06.2024

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyna Niesyto, zatytułowanej:

„Zaprojektowanie szczepionych poli(cieczy jonowych) jako potencjalnych układów dostarczania leków w terapii przeciwbakteryjnej”

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej z dnia 22.05.2024 r. zgodnie z Uchwałą Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej podjętą w dniu 22.05.2024 r.

Przedłożoną do recenzji rozprawę doktorską pani mgr inż. Katarzyna Niesyto wykonała w Katedrze Fizykochemii i Technologii Polimerów na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach, pod kierunkiem promotora pani prof. dr hab. inż. Doroty Neugebauer.

Rozprawę doktorską mgr inż. Katarzyny Niesyto stanowi cyklu siedmiu artykułów (P.1. – P.7.) opublikowanych w latach 2020-2023 w czasopismach z listy Journal Citation Reports o współczynniku wpływu IF w zakresie od 3,4 do 6,208, takich jak: *Polymers* (1 artykuł), *International Journal of Molecular Sciences* (3 artykuły), *Materials* (1 artykuł), *Pharmaceutics* (1 artykuł) i *Journal of Biomedical Materials Research Part B - Applied Biomaterials* (1 artykuł). Warto zwrócić uwagę na wysoki, zarówno sumaryczny IF przedstawionego cyklu 28,944, jak i łączną liczbę punktów według MEiN – 1040. Należy podkreślić, czego nie uczyniła Autorka, że uzyskane wyniki, jak wynika z przedstawionego dorobku naukowego Doktorantki stały się podstawą kilku zgłoszeń patentowych. Większość przeprowadzonych badań i otrzymanych wyników powstała w ramach realizacji projektu OPUS (nr 2017/27/B/ST5/00960; 2019-2022), którego pani Niesyto była stypendystką. We wszystkich pracach cyklu Doktorantka jest pierwszym autorem. Fakt ten, jak i deklaracja Doktorantki o jej wkładzie autorskim oraz przedstawione oświadczenia współautorów podające procentowy wkład autorski potwierdzają istotną rolę mgr inż. Katarzyny Niesyto w powstaniu niniejszych prac. Jak wynika z deklaracji Doktorantki o jej wkładzie autorskim, brała ona udział w opracowaniu koncepcji i planu badań, syntezowała materiał do badań, który scharakteryzowała także pod kątem uwalniania leków i podstawowych badań biologicznych, a także brała czynny udział w interpretacji wyników i w przygotowaniu publikacji.

Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych jest instytutem Polskiej Akademii Nauk

Badania realizowane przez panią mgr inż. Niesyto w pracy doktorskiej dotyczyły opracowania i badania nowych polimerowych systemów dostarczania leków. Pomysł zastosowania nośników leków do dostarczania związku aktywnego biologicznie do miejsca docelowego pojawił się w latach 60 XX wieku, ale istotny rozwój badań w tym kierunku nastąpił na początku lat 80, gdy wprowadzono w Europie pierwszy lek, uwalniany z biodegradowalnych mikrocząstek polimeru (Decapeptyl®). Opracowanie skutecznych układów kontrolowanego dostarczania leków (DDS), niosących ze sobą wiele korzyści dla zdrowia pacjentów poprzez poprawę efektywności działania substancji leczniczej i zmniejszenie nasilenia skutków ubocznych, stanowi bardzo duże wyzwanie mieszczące się w obszarze badań interdyscyplinarnych, a prace w tym zakresie wciąż są podejmowane. Dlatego też niniejsza rozprawa doktorska wpisuje się w wiodące trendy badawcze współczesnej farmakoterapii, ważne z punktu widzenia całego społeczeństwa.

Koncepcja opracowania nowych układów dostarczania leków w recenzowanej dysertacji, jak wynika z przedstawionego przez Doktorantkę celu i zakresu pracy, opierała się na syntezie amfifilowych kopolimerów szczepionych zawierających jednostki cieczy jonowej, różniących się jej zwartością, całkowitym stopniem polimeryzacji łańcucha głównego i łańcuchów bocznych, liczbą łańcuchów bocznych i stopniem szczepienia. Dodatkowo Doktorantka otrzymała analogiczne kopolimery liniowe w celu określenia wpływu topologii kopolimerów na uwalnianie leku. Otrzymanie polimerów o odpowiedniej budowie jest kluczowym zagadnieniem decydującym nie tylko o uzyskaniu korzystnych właściwości fizykochemicznych, ale i odpowiedniej kinetyki uwalniania substancji biologicznie aktywnych. Jak wynika z przedstawionego przez Doktorantkę „Wprowadzenia” w Przewodniku po cyklu publikacji, zastosowanie DDS w postaci koniugatów poli(cieczy jonowej) jest rzadko realizowane. Otrzymanie zaprojektowanych kopolimerów stworzyło możliwość przygotowania DDS typu koniugat i micela, mogących zawierać jednocześnie dwa różne leki o działaniu synergicznym. Jak podkreśla Autorka takie układy z dwoma lekami antybakteryjnymi stosowanymi do leczenia chorób płuc, nie były wcześniej opisane w literaturze. Jako biokompatybilne monomery zastosowała Doktorantka metakrylan metylu (MMA) oraz ciecz jonową - chlorek [2(metakryloiloksy)etylo]trimetyloamoniowy (TMAMA). Kopolimery o takiej budowie w wyniku obecności kationu trimetyloamoniowego są już aktywne biologicznie. Z kolei obecność anionu chlorkowego umożliwia jego wymianę jonową na aniony farmaceutyczne i otrzymanie koniugatów jonowych polimer-lek. Jako substancje biologicznie aktywne zastosowała pani Niesyto aniony farmaceutyczne p-aminosalicylanu (PAS^-), klawulaniumu (CLV^-), piperacyliny (PIP^-) i fusydanu (FUS^-) oraz izoniazyd (ISO), tazobaktam (TAZ) i ryfampicynę (RIF) stosowane w leczeniu chorób dolnych dróg oddechowych, w tym gruźlicy. Syntezowane kopolimery

Doktorantka wykorzystwała do przygotowania koniugatów z anionami farmaceutycznymi, miceli z lekiem w formie niejonowej oraz miceli zawierających pary leków, czyli lek w postaci jonowej i niejonowej. Następnie przeprowadziła badania zawartości leku i procesu jego uwalniania z wytworzonych układów *in vitro* w buforze fosforanowym oraz dla wyselekcjonowanych DDS badania cytotoxyczności na wybranych liniach komórkowych, w aspekcie budowy kopolimerów, rodzaju DDS i leku. Warto zwrócić uwagę na szeroki i kompleksowy zakres pracy podjęty przez Autorkę, który rozpoczyna się od syntezy, a kończy na sprawdzeniu potencjału aplikacyjnego przygotowanych układów dostarczania leków.

Publikacje stanowiące rozprawę doktorską pani Katarzyny Niesyto, poddano już weryfikacji naukowej przez recenzentów, dlatego też moja uwaga koncentruje się na ocenie spójności przedstawionego zbioru prac oraz Przewodnika po cyklu publikacji z punktu widzenia umiejętności Doktorantki w zaprezentowaniu zagadnień dysertacji.

Po lekturze artykułów tworzących rozprawę stwierdzam, że stanowią one spójny tematycznie cykl prac zgodny z tematem doktoratu. Są to obszernie prace przedstawiające realizowane kompleksowe badania mieszczące się w zakresie dysertacji. W pracy P.1 przedstawiono syntezę (i) makroinicjatora, (ii) 8 kopolimerów szczepionych zawierających jednostki cholinowe w łańcuchach bocznych (G1-G8) różniących się stopniem szczepienia (26 i 46 % mol), stosunkiem użytych komonomerów (TMAMA:MMA=25:75 i 50:50), masą molową i jej rozrzutem oraz (iii) koniugatów z anionami p-aminosalicylanu i klawulanianu wraz z charakterystyką ich uwalniania. W kolejnej pracy P.2 opisano syntezę trzech kopolimerów liniowych o różnej zawartości cieczy jonowej (TMAMA:MMA=25:75, 50:50 i 75:25), dwa z nich są odpowiednikami kopolimerów szczepionych, do których następnie wprowadzono też aniony PAS⁻ i CLV⁻ oraz piperacyliny i analizowano proces ich uwalniania. Publikacja P.3 poświęcona jest trzem kopolimerom szczepionym, wcześniej już prezentowanych w P.1 (oznaczonych w Przewodniku jako G4, G6 i G7), do których przyłączono anion farmaceutyczny fusydanu i następnie utworzono z nich micelle zawierające dodatkowo ryfampicynę oraz badano proces uwalniania leków zarówno z koniugatów jak i z miceli. W manuskrypcie P.4 znajdujemy opis koniugatów PAS⁻ z kopolimerami liniowymi, ale nieuwzględnionymi w doktoracie oraz koniugatów z sześcioma kopolimerami szczepionymi (w tym trzema oznaczonymi w Przewodniku jako G4, G6 i G70) oraz charakterystykę utworzonych z nich miceli zawierających izoniazyd wraz z analizą uwalniania tych leków i badaniami cytotoxyczności *in vitro* wybranych pięciu DDS, z czego dwa opisano w Przewodniku (micelle: G6 z ISO i G6-PAS⁻/ISO), stosując model ludzkich komórek nabłonka oskrzeli (BEAS-2B) przy dwóch różnych stężeniach DDS. Układy otrzymane z kopolimerów G4, G6 i G7 zawierające anion piperacyliny i tazobaktam zaprezentowano w pracy P.5, dla których profile uwalniania analizowano za pomocą modelu kinetyki I-ego rzędu, Higuchiego i Korsenmeyera –

Peppasa, których dopasowanie kształtowało się na różnych poziomach w zależności od kopolimeru i leku. Stwierdzono, że uwalnianie leków nie zachodziło zgodnie z mechanizmem zerowego rzędu. Do analizy cytotoksyczności wybrano trzy DDS z G6, czyli koniugat z anionem PIP⁻, micelle z TAZ i micelle z oboma lekami stosując również BEAS-2B. Praca P.6 dotyczy badania cytotoksyczności układów zawierających kopolimery G2, G3 i G6 z anionami PAS⁻ i CLV⁻ z wykorzystaniem modelu BEAS-2B oraz linii nowotworowych gruczolaka ludzkiej linii komórek podstawnych nabłonka pęcherzyków płucnych (A549). Ostatnia praca (P.7) cyklu stanowiącego dysertację poświęcona ocenie biologicznej DDS otrzymanych z kopolimeru liniowego L1 i anionów PAS⁻, CLV⁻ i PIP⁻ przy użyciu modeli stosowanych w poprzedniej pracy BEAS-2B i A549 oraz dodatkowo linii komórek niedrobnokomórkowego raka płuc (H1299).

Przechodząc do oceny przedstawionego do recenzji 74 stronicowego Przewodnika - komentarza do cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską stwierdzam, że jest on bardzo starannie przygotowany i obejmuje:

- streszczenie w j. angielskim i polskim,
- wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską,
- informacje o wkładzie autorskim doktorantki,
- wykaz stosowanych skrótów,
- cel i zakres badań,
- wprowadzenie liczące 10 stron,
- 24 stronicowe omówienie wyników,
- podsumowanie i wnioski zajmujące 3 strony,
- bogatą bibliografię liczącą 207 pozycji.
- wykaz rysunków i tabel oraz dorobku naukowego Doktorantki. Natomiast kopie publikacji tworzące cykl wraz z oświadczeniami współautorów podających procentowy ich wkład autorski stanowią odrębny załącznik.

Oceniając sposób jego zredagowania stwierdzam, że Doktorantka posługuje się poprawnym językiem i stosuje prawidłową terminologię, chociaż nie ustrzegła się drobnych potknięć, np. określenia „*analogowych polimerów*”, „*z pierścieni sprzężonych*” (str. 29) - w otrzymanych materiałach z FUS⁻ nie ma takich pierścieni, błąd w wyjaśnieniu M_n, w tytule podrozdziału 3.7. powinny być również podane prac P.4 i P.5. Ponadto należy podkreślić praktycznie brak anglicyzmów, co się coraz rzadziej zdarza w pracach doktorskich w dziedzinie Nauk ścisłych i przyrodniczych.

We „Wprowadzeniu” naświetlono problem badawczy i przedstawiono zagadnienia ściśle związane z zakresem pracy doktorskiej, a do jego przygotowania Autorka skorzystała aż z 192 pozycji literaturowych właściwie dobranych. Kolejny rozdział stanowi „Omówienie wyników” i

tutaj pragnę zwrócić uwagę na przemyślane opracowanie tej części, wymagające dojrzałości naukowej, ponieważ ten rozdział nie stanowi, jak to często bywa, oddzielnych opisów poszczególnych publikacji. Prezentowane wyniki pogrupowane są w poszczególne zagadnienia badawcze tworzące podrozdziały dotyczące: syntezy kopolimerów (3.1.) i z nich koniugatów jonowych (3.2.), badania zachowania kopolimerów i koniugatów w środowisku wodnym (3.3.), analizy uwalniania z nich anionów farmaceutycznych (3.4.), przygotowania układów DDS typu micelle z wykorzystaniem kopolimerów szczepionych (3.5.) i uwalniania z nich leków (3.6.) oraz biologicznej oceny otrzymanych układów (3.7). Opis wyników uzupełniają 2 tabele oraz 17 rysunków przygotowanych na potrzebę niniejszego Przewodnika po zbiorze publikacji.

Realizując pracę doktorską mgr inż. Katarzyna Niesyto wykazała się biegłością w zakresie syntezy organicznej obejmującej kontrolowaną polimeryzację rodnikową z przeniesieniem atomu (ATRP), reakcje estryfikacji i wymiany jonowej. ATRP zastosowała doktorantka do otrzymania makroinicjatorów z MMA i metakrylanu 2-hydroksyetylu (HEMA) różniących się zawartością jednostek z grupami hydroksylowymi oraz finalnych kopolimerów szczepionych (G1-G8) o stopniu szczepienia (26 i 46% mol.) i różniących się wyjściowym stosunkiem komonomerów TMAMA:MMA=25:75 i 50:50, otrzymanych przy użyciu techniki „szczepienia z” wielofunkcyjnym makroinicjatorem oraz kopolimerów liniowych (L1-L3) przy zastosowaniu TMAMA:MMA=25:75, 50:50 i 75:25. W celu otrzymania wielofunkcyjnego makroinicjatora (MI) autorka przeprowadziła reakcję estryfikacji grup hydroksylowych p(MMA-co-HEMA) otrzymując grupy bromoestrowe. Stosując reakcje wymiany jonowej anionów chlorkowych obecnych w kopolimerach na aniony farmaceutyczne, których wybór został uzasadniony, a także wykorzystując amfifilowy charakter kopolimerów, otrzymała odpowiednio DDS jako koniugaty i micelle. Dla osiągnięcia założonych celów Doktorantka zastosowała szereg prawidłowo dobranych metod badawczych takich jak: (i) metody spektroskopowe ^1H NMR i dla wybranych FTIR, zastosowane do charakterystyki syntezowanych kopolimerów oraz UV-Vis do ustalenia zawartości leku w przygotowanych DDS i określenia profilu uwalnianych substancji farmakologicznych z układów w założonym czasie, (ii) chromatografii GPC do wyznaczenia mas molowych kopolimerów, (iii) pomiary przy użyciu goniometru do określenia napięcia międzyfazowego roztworów wodnych kopolimerów metodą wiszącej kropli, w celu określenia krytycznego stężenia micelizacji oraz wyznaczenia kąta zwilżania powierzchni warstwy kopolimerowej techniką „posadzenia kropli” wody dla określenia stopnia hydrofilowości/hydrofobowości kopolimerów, (iv) metodę dynamicznego rozpraszanie światła do wyznaczenia wielkości cząstek DDS oraz (v) badania kolorymetryczne w celu oceny cytotoksyczności badanych DDS z użyciem bromku 3-(4,5- dimetylotiazol-2-ilo)-2,5- difenylotetrazoliowego oraz analizy metodą cytometrii przepływowej, obejmujące test apoptozy i

analizy cyklu komórkowego. Doktorantka wykazała się umiejętnością w zakresie interpretacji otrzymanych wyników i wysuwania odpowiednich wniosków.

Z racji roli recenzenta mam kilka uwag niewpływających na ogólną wysoką ocenę rozprawy. W streszczeniu rozprawy doktorskiej można było oczekiwać podania obu stosowanych komonomerów, a jest mowa tylko o TMAMA. Podobnie w opisie celu i zakresu badań, informacja o drugim komonomerze pojawia się dopiero przy opisie zadań realizowanych w pracy. W Streszczeniu pojawia się stwierdzenie, że „*Na kinetykę uwalniania miała wpływ struktura kopolimeru i charakter leku*” aczkolwiek kinetykę - badania mechanizmu uwalniania opisano tylko w pracy P.5. i nie omawia Autorka tego w Przewodniku. Doktorantka podaje, że do syntezy kopolimerów liniowych i szczepionych stosowano odpowiednio trzy (TMAMA:MMA=25:75, 50:50 i 75:25) i dwa (TMAMA:MMA=25:75 i 50:50) różne stosunki monomerów wyjściowych, można się zastanawiać dlaczego nie otrzymano kopolimerów szczepionych przy stosunku TMAMA:MMA= 75:25. Zabrakło informacji jakie właściwości zdecydowały o wyborze do dalszych badań kopolimerów G4, G6 i G7. Doktorantka bardzo ogólnie podaje, że „*Następnie, do reakcji z solami PIP⁻ i FUS⁻ dokonano selekcji i wybrano układy potencjalnie najbardziej korzystne, tj. G4, G6 i G7...*”(str. 27). Kopolimery tworzyły struktury o zróżnicowanych rozmiarach nanometrycznych, jednak nie wszystkie były nanocząstkami, ponieważ średnice hydrodynamiczne niektórych osiągały ponad 300 nm. W „Podsumowaniu” można było oczekiwać wskazania, który z otrzymanych DDS jest najbardziej obiecujący pod kątem dalszych badań.

W podsumowaniu recenzji chcę podkreślić kompleksowy charakter i wysoki poziom badań przeprowadzonych przez panną Katarzynę Niestyto w ramach pracy doktorskiej, a otrzymane przez nią wyniki z pewnością przyczyniają się do rozwoju dyscypliny nauki chemiczne.

Reasumując, uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim przez ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2018 poz. 1668 z późn. zm), w związku z czym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej o dopuszczenie pani mgr. inż. Katarzyny Niestyto do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wartość naukową przeprowadzonych badań, wysoki poziom recenzowanej dysertacji oraz dorobek naukowy Autorki wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Niestyto.

Schab-Balczuk