



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych

ul. Grunwaldzka 6
60-780 Poznań

Dział Obsługi Rady ds. Nauki i Doktorantów
WPŁYNEŁO

04. 01. 2024

tel.: 61 854-66-30
fax: 61 854-66-39
e-mail: syntezy@ump.edu.pl

Poznań, dnia 2 stycznia 2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Tytuł pracy: Innowacyjne systemy polimerowe w terapii nadciśnienia tętniczego – otrzymywanie, badania strukturalne, fizykochemiczne i biologiczne

Imię i nazwisko: mgr farm. Maria Bialik

Miejsce realizacji pracy doktorskiej: Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej i Biomateriałów, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Promotor: dr hab. inż. Ewa Olędzka

Promotor pomocniczy: dr Marzena Kuras

Pani mgr Maria Bialik podczas realizacji pracy doktorskiej włączyła się w multidyscyplinarne badania innowacyjnych systemów polimerowych do terapii nadciśnienia tętniczego, w zakresie ich otrzymywania, charakterystyki strukturalnej i fizykochemicznej, a także oceny biologicznej i farmaceutycznej. Tematyka ta jest rozwijana od wielu lat z bardzo interesującymi rezultatami w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej i Biomateriałów pod kierunkiem promotora niniejszej pracy, Pani dr hab. inż. Ewy Olędzkiej i promotora pomocniczego, Pani dr Marzeny Kuras. Problem badawczy sformułowany w temacie pracy dotyczy szeregu aspektów szczegółowych zmierzających do poszerzenia wiedzy na temat biodegradowalnych i biokompatybilnych systemów polimerowych jako nośników substancji aktywnych farmaceutycznie o działaniu przeciwnadciśnieniowym. Jednakże w szerszym znaczeniu pozwala na pogłębienie wiedzy na temat skutecznego leczenia chorób serca i układu krążenia. Temat badań jest bardzo aktualny naukowo, gdyż obejmuje poszukiwania nowoczesnych rozwiązań dla chorób o znaczeniu cywilizacyjnym. Ponadto zagadnienie badawcze jest obecnie bardzo uzasadnione zarówno społecznie, jak i ekonomicznie, biorąc pod uwagę przewlekły przebieg i koszty prowadzenia terapii nadciśnienia tętniczego.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Marii Bialik stanowi spójny tematycznie zbiór czterech publikacji. Rozprawa składa się z następujących elementów: wykazu skrótów, streszczeń w języku polskim i angielskim, wykazu publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, informacji o aktywności konferencyjnej i w projektach naukowych Doktorantki, wprowadzenia, założeń i celu badań, etapów realizacji pracy doktorskiej, opisu przeprowadzonych badań, podsumowania i wniosków, bibliografii oraz załączonych publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Na początku rozprawy Doktorantka zamieściła informację na temat źródła finansowania badań ze środków statutowych przyznanych Warszawskiemu Uniwersytetowi Medycznemu z MEiN, w tym Grantu Młodego Badacza. Na końcu dysertacji Doktorantka zamieściła oświadczenia o wkładzie własnym, jak i pozostałych współautorów

w powstanie publikacji wchodzących w skład cyklu. Poszczególne rozdziały i publikacje zostały napisane poprawnym językiem naukowym. Kolejność przedstawiania danych i cytowane w pracach piśmiennictwo nie budzą zastrzeżeń recenzenta.

W rozdziale **Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej** Doktorantka zamieściła dane bibliometryczne czterech prac. We wszystkich współautorskich pracach mgr Maria Bialik jest pierwszym autorem. Ze spisu wynika, że prace przeglądowe oznaczone P1 i P2 zostały opublikowane odpowiednio w *Expert Opinion on Drug Delivery* oraz *International Journal of Molecular Sciences*. Z kolei prace oryginalne oznaczone odpowiednio P3 i P4 zostały opublikowane w *International Journal of Molecular Sciences* oraz *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. Sumaryczny współczynnik oddziaływania prac wchodzących w zakres rozprawy mierzony IF wynosi 21,646 oraz 490 pkt. MEiN. Należy zaznaczyć, że czasopisma, w których zostały opublikowane prace należą do wiodących czasopism dla dyscypliny nauk farmaceutycznych w obszarze chemii medycznej i technologii postaci leku. W rozdziale **Wystąpienia na konferencjach naukowych**, Doktorantka zamieściła spis pięciu konferencji naukowych zarówno autorskich, jak i współautorskich, na których przedstawiła tematykę badań bardzo spójną z tematyką dysertacji. Z kolei w rozdziale **Projekty naukowe** mgr Maria Bialik zawarła informację o grantach badawczych, w których pełniła funkcję kierownika, a które uzyskała z Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Pani mgr Maria Bialik posiada w mojej ocenie bardzo dobry dorobek naukowy. Warto dodać, że prace Doktorantki wg bazy WoS na dzień 31.12.2023 r. zostały zacytowane 21 razy, w tym 13 razy praca przeglądowa oznaczona P2 z *International Journal of Molecular Sciences*.

Doktorantka dokonała właściwego wyboru tematyki do **Wprowadzenia**, w którym zawarła informacje na temat nadciśnienia tętniczego, poruszając kolejno temat epidemiologii tej choroby, terapii skojarzonej, ograniczeń w stosowaniu leków hipotensyjnych, adherence i polipragmazji. Pani mgr Maria Bialik bardzo słusznie zauważyła, że problemy z dawkowaniem i biodostępnością leków doustnych można rozwiązać poprzez wprowadzanie innowacyjnych systemów postaci leków opartych na biodegradowalnych i bioresorbowalnych polimerach, w tym koniugatach wielkocząsteczkowych, mikrokapsułkach i nanocząstkach polimerowych. W kolejnym podrozdziale wprowadzenia omówiła w bardzo zwięzły sposób syntetyczne polimery biodegradowalne w farmacji, w tym polimery jako nośniki substancji czynnych, polimerowe nano- i mikrocząstki, wielocząsteczkowe koniugaty substancji czynnej, omówiła mechanizmy i kinetykę uwalniania substancji czynnych z nośników polimerowych. W ostatnim podrozdziale omówiła innowacyjną postać leku w postaci termowrażliwego płynnego czopka. Zebrany materiał literaturowy stanowi zwarte oraz kompletne kompendium o dużej wartości naukowej, które sprawia, że poruszone w dalszych częściach pracy zagadnienia są bardzo dobrze wpisane w poruszaną tematykę.

Zaplanowane przez Doktorantkę w **Założeniach i celu badań** prace miały doprowadzić do otrzymania innowacyjnego systemu opartego na biodegradowalnym nośniku polimerowym, uwalniającego substancję hipotensyjną w sposób przedłużony i kontrolowany. Cel ten miał być realizowany poprzez (i) opracowanie i zoptymalizowanie metody syntezy biodegradowalnych i biokompatybilnych nośników polimerowych, charakteryzujących się ściśle założoną mikrostrukturą, właściwościami fizykochemicznymi i biologicznymi oraz topologią, (ii) otrzymaniem i charakterystyką systemów terapeutycznych, w tym wielkocząsteczkowych koniugatów i nanocząstek, zawierających substancję czynną o działaniu hipotensyjnym, (iii) opracowanie

innowacyjnej postaci leku w postaci termowrażliwego płynnego czopka do zastosowań w terapii nadciśnienia. W rozdziale **Etapy realizacji pracy doktorskiej**, Doktorantka zaplanowała najpierw studia literaturowe na temat zastosowań poliestrów w technologii postaci leku oraz termowrażliwych płynnych czopków do doodbytniczego podania substancji czynnych. W dalszej kolejności postanowiła skupić się na syntezie, charakterystyce matryc polimerowych, ocenie ich właściwości biologicznych, otrzymaniu i charakterystyce wielkocząsteczkowych koniugatów polimerowych z substancją o działaniu hipotensyjnym, a także otrzymaniu i charakterystyce spektroskopowej oraz fizykochemicznej innowacyjnych dwuwarstwowych nanosystemów polimerowych z substancjami o działaniu hipotensyjnym wraz z oceną ich cytotoksyczności. Ostatni etap badań przewidywał otrzymanie termowrażliwych płynnych czopków z substancją czynną wraz z oceną ich cytotoksyczności i badaniem kinetyki uwalniania substancji czynnej.

W rozdziale **Opis przeprowadzonych badań** Doktorantka przedstawiła studia literaturowe i badania eksperymentalne wraz z ich interpretacją zawartą w **Publikacjach P1-P4**, których pełne wersje zamieściła w rozdziale **Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej**.

P1 – *Expert Opinion on Drug Delivery* z 2019 r. – W artykule przeglądowym Doktorantka podsumowała stan wiedzy na temat biodegradowalnych, syntetycznych poliestrów wykorzystywanych w systemach kontrolowanego uwalniania substancji aktywnych farmaceutycznie o działaniu hipotensyjnym. W pracy poruszyła kwestię pewnych ograniczeń substancji czynnych wynikających przeważnie z ich właściwości fizykochemicznych i farmakokinetycznych, które przekładają się na zmniejszenie adherence i efektywności terapii. Omówiła możliwości modyfikacji parametrów farmakokinetycznych substancji aktywnych farmaceutycznie o działaniu hipotensyjnym z użyciem biodegradowalnych poliestrowych systemów do kontrolowanego uwalniania, skupiając się na PCL, PLA, PLACL i PLAGA.

P2 – *International Journal of Molecular Sciences* z 2021 r. – W artykule przeglądowym mgr Maria Bialik zebrała światowe piśmiennictwo na temat możliwości zastosowania termowrażliwych płynnych czopków w terapii różnych schorzeń. Wskazała na zalety i ograniczenia podawania substancji aktywnych farmaceutycznie drogą doustną i doodbytniczą. W pracy omówiła składniki niezbędne do otrzymania termowrażliwych płynnych czopków, zwracając szczególną uwagę na termowrażliwe i mukoadhezyjne polimery. Doktorantka scharakteryzowała poloksamery P407 i P188, PVP, alginian sodu, Carbopol®, pochodne celulozy – HEC, MC, CMC i HPMC. Przedstawiła przykłady licznych termowrażliwych płynnych czopków z substancjami aktywnymi farmaceutycznie o działaniu przeciwbólowym i NLPZ, przeciwnowotworowym, przeciwwymiotnym, hipotensyjnym, psychiatrycznym, przeciwoalegicznym i przeciwmalarycznym oraz hormonów. Doktorantka wykazała, że termowrażliwe płynne czopki mogą stanowić perspektywę użycia substancji czynnych zarówno o działaniu miejscowym, jak i ogólnoustrojowym.

P3 – *International Journal of Molecular Sciences* z 2022 r. – W artykule oryginalnym Doktorantka przedstawiła wyniki badań związanych z opracowaniem technologii otrzymywania termowrażliwego płynnego czopka opartego na biodegradowalnych nanocząstkach polimerowych z winianem metoprololu. Pani mgr Maria Bialik zastosowała polimeryzację z otwarciem pierścienia z użyciem katalizatora dietylocynku oraz inicjatora procesu PEG do uzyskania matrycy kopolimerowej poli(L-laktyd-ko-glikolid) (PLAGA), którą poddała charakterystyce spektroskopowej NMR, FTIR, analizie mikrostruktury, a także

określeniu średniej masy cząsteczkowej i współczynnika dyspersji. Z kolei z użyciem spektrometrii F-AAS oznaczyła pozostałości po zastosowanym katalizatorze. Brak toksyczności materiału potwierdziła wynikami umu-testu oraz testu wychwytu czerwieni obojętnej. W dalszej części pracy Doktorantka przedstawiła otrzymywanie nanocząstek z metoprololem metodą koacerwacji z użyciem surfaktanta. Warto dodać, że przeanalizowała trzy różne stosunki masowe kopolimeru PLAGA i substancji czynnej farmaceutycznie. Nanocząstki zostały scharakteryzowane pod względem średniej wielkości, polidispersyjności oraz wartości potencjału zeta z użyciem techniki dynamicznego rozpraszania światła, a ich kształt i wielkość potwierdzono za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Należy podkreślić, że uzyskane nanocząstki charakteryzowały się wysokimi stopniami homogenności i monodispersyjności wyrażonymi wartościami średniej wielkości oraz PDI. Warto dodać, że nanocząstki charakteryzowały się też wysokim poziomem enkapsulacji substancji czynnej w zakresie 33-43%. Dla uzyskanych nanocząstek Doktorantka wykonała testy uwalniania substancji czynnej, do których analizy zaproponowała modele matematyczne. Materiał ten posłużył do uzyskania termowrażliwych płynnych czopków, dla których Doktorantka przeanalizowała szereg parametrów mechanicznych i reologicznych, co pozwoliło na wyselekcjonowanie dwóch formułacji termowrażliwych czopków o preferowanych parametrach, dla których przeprowadzono ocenę cytotoxyczności.

P4 - *Journal of Drug Delivery Science and Technology* z 2023 r. - W artykule oryginalnym Doktorantka przedstawiła wyniki badań związanych z otrzymaniem dwuwarstwowych nanosystemów do jednoczesnego dostarczania dwóch substancji hipotensyjnych – atenololu i furosemidu. Mgr Maria Bialik przedstawiła syntezę i charakterystykę matryc kopolimerowych złożonych z rutyny oraz GA, L-LA i CL w różnych stosunkach molowych, w których syntezie wykorzystano reakcje polimeryzacji z otwarciem pierścienia i katalizator dietylocynk. Strukturę uzyskanych materiałów Doktorantka potwierdziła z użyciem technik NMR i FTIR, a następnie określiła mikrostrukturę kopolimerów. W badaniach przewidziano także uzyskanie matrycy homopolimerowej PLLA, celem dalszego jej użycia jako drugiej warstwy polimerowej w wielowarstwowym nanosystemie dostarczania substancji hipotensyjnych, którą poddała wnikliwej charakterystyce z użyciem spektroskopii NMR. Otrzymane matryce polimerowe zostały ocenione techniką SEC-MALLS z wyznaczeniem średniej masy cząsteczkowej i współczynnika dyspersji. Z kolei z użyciem spektrometrii F-AAS oznaczyła pozostałości katalityczne. Brak cyto- i genotoksyczności matryc potwierdziła wynikami umu-testu oraz testu wychwytu czerwieni obojętnej. Matryce polimerowe poddano reakcji estryfikacji Steglicha z furosemidem, otrzymując cztery wielocząsteczkowe koniugaty polimerowe, które następnie scharakteryzowano z użyciem NMR. W kolejnym etapie badań wielocząsteczkowe koniugaty i homopolimer PLLA posłużyły do uzyskania czterech dwuwarstwowych systemów polimerowych, w których stanowiły ich rdzeń, a warstwę zewnętrzną stanowiła uprzednio zsyntezowana i scharakteryzowana matryca homopolimerowa PLLA z zainkorporowanym atenololem. Materiały te zostały poddane charakterystyce z użyciem DLS - określono ich średnie wielkości, PDI oraz wartości potencjału zeta. Wielkości materiałów potwierdzono także techniką TEM, a struktury dodatkowo SEM. W końcowym etapie pracy określono profile uwalniania atenololu i furosemidu z otrzymanych czterech dwuwarstwowych nanosystemów, a dla reprezentatywnego nanosystemu i jego składowych przeprowadzono testy toksyczności na ludzkiej linii HEK293, a także testy NRU, MTT i LDH.

Najważniejsze wyniki i wnioski z badań zostały zawarte w **Podsumowaniu i wnioskach**. Rozdział **Bibliografia** zawiera 27 odpowiednio dobranych pozycji literaturowych w większości z ostatnich 15 lat.

Treść rozprawy doktorskiej Pani mgr Marii Bialik zawarta w cyklu czterech artykułów naukowych jest zgodna z tezą postawioną w tytule. Praca była realizowana według dobrze przemyślanego schematu, co pozwoliło na zweryfikowanie wielu hipotez. Hipoteza zawarta na początku badań dotycząca otrzymania nowego i innowacyjnego systemu polimerowego do kontrolowanego i przedłużonego uwalniania substancji hipotensyjnych w miarę postępu badań została pozytywnie zweryfikowana i doprowadziła do bardzo interesujących wniosków. Przeprowadzone prace eksperymentalne pozwoliły na opracowanie i zoptymalizowanie metod syntezy serii biodegradowalnych matryc homo- oraz kopolimerowych wraz z otrzymaniem wielkocząsteczkowych polimerowych systemów terapeutycznych z substancjami hipotensyjnymi, a także opracowanie innowacyjnej, doodbytniczej i żelowej postaci leku w formie termowrażliwego płynnego czopka. Stwierdzam, że wszystkie dane zostały w przedstawionych do oceny publikacjach bardzo krytycznie omówione w kontekście światowego piśmiennictwa i bezpośrednich doświadczeń Zespołu. Uzyskane wyniki mają więc duże znaczenie poznawcze i stanowią istotny wkład do technologii postaci leku i nanotechnologii farmaceutycznej z uwagi na opracowanie termowrażliwych płynnych czopków o zoptymalizowanych właściwościach reologicznych i mechanicznych. Doktorantka otrzymała serię biodegradowalnych matryc homo- oraz kopolimerowych z użyciem monomerów: ϵ -kapolaktonu, L-laktydu i glikolidu, w reakcjach polimeryzacji z otwarciem pierścienia w obecności dietylocynku jako katalizatora procesu oraz glikolu polioksyetylenowego lub rutyny jako inicjatorów reakcji. Uzyskane produkty zostały bardzo dobrze scharakteryzowane technikami spektroskopowymi ^1H i ^{13}C NMR oraz FTIR. Z kolei dopuszczalną zawartość pozostałości cynku oceniono techniką atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w płomieniu. Warto dodać, że wykorzystując chromatografię wykluczenia zależnego od wielkości cząsteczek z wielokątowym rozpraszaniem światła wyznaczono średnią masę cząsteczkową oraz współczynnik dyspersji produktów polimeryzacji. Na uwagę zasługuje także ocena cyto- i genotoksyczności z użyciem umu-testu i testu wychwyty czerwieni obojętnej.

Należy dodać, że w świetle załączonych oświadczeń współautorów, wkład Pani mgr Marii Bialik w powstanie publikacji jest znaczący. Dotyczył różnych etapów przygotowania, przeprowadzenia i opracowania badań oraz przygotowania publikacji. Nie mam najmniejszych wątpliwości, że przedstawione i już opublikowane dane eksperymentalne posiadają wysoką wartość merytoryczną, gdyż Doktorantka (i) zastosowała nowoczesny warsztat badawczy, zarówno w aspekcie technologii otrzymywania materiałów i formulacji, jak i też ich charakterystyki fizykochemicznej oraz farmaceutycznej; (ii) podjęła się prowadzenia badań bardzo aktualnych naukowo w technologii postaci leku, a co najważniejsze skutecznie je zrealizowała, co pozwoliło na opracowanie technologii otrzymywania termowrażliwych płynnych czopków jako drogi podania substancji aktywnych o działaniu hipotensyjnym, poszerzenia wiedzy na temat możliwości zastosowania biodegradowalnych estrów jako nośnika dla substancji aktywnych farmaceutycznie o działaniu hipotensyjnym, zoptymalizowania syntezy biodegradowalnych matryc kopolimerowych, a także otrzymywania dwuwarstwowych nanosystemów opartych na biodegradowalnych nanonośnikach polimerowych; (iii) uzyskała wyniki stwarzające perspektywy opracowania nowych postaci leków

hipotensyjnych, a tym samym poprawy jakości i skuteczności terapii przeciwnadciśnieniowej dla wielu pacjentów, prowadzone badania mają więc także duże znaczenie społeczne i ekonomiczne.

Wszystkie rozdziały i publikacje zawarte w dysertacji zostały napisane bardzo poprawnym językiem naukowym. Zwracam uwagę na wyrażenie napotkane w streszczeniu – „zsyntetyzowała” i na stronie 18 – „syntetyzowany” - to galizm (fr. *synthétiser*), sugeruję po prostu syntezować. W metodyce pracy P3 na str. 13 podano wartość 70% jako graniczną przy ocenie cytotoksyczności na linii BALB/c 3T3 (co też słusznie koryguje jednostkę podaną na str. 9) – Proszę o wyjaśnienie na podstawie jakich danych literaturowych, czy też doświadczeń Zespołu tę wartość potraktowano jako referencyjną? W czasie lektury publikacji przeglądowej P2 pojawiła się kwestia o charakterze dyskusyjnym, o której rozwinięcie poproszę Doktorantkę - Jakie ograniczenia chorobowe będą eliminowały całkowicie lub okresowo stosowanie u pacjenta doodbytniczej drogi podania leków hipotensyjnych? W odniesieniu do pracy P3 proszę o przybliżenie technologii przygotowania czopków z substancją czynną według stosowanej w pracy metody na zimno.

Reasumując uważam, że Pani mgr Maria Bialik doskonale zmierzyła się z postawionym w temacie pracy problemem, wykazała się znajomością zagadnień teoretycznych i przygotowaniem warsztatowym. Moja wysoka ocena wartości merytorycznej przedstawionej dysertacji wynika z umiejętnego połączenia przez Doktorantkę wiedzy z zakresu chemii materiałowej, nanotechnologii i technologii postaci leku. Przekazana do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia wymogi stawiane tego typu pracom, dlatego też wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Marii Bialik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoką merytoryczną wartość przedłożonej do recenzji dysertacji, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny z wnioskiem o wyróżnienie przedmiotowej pracy doktorskiej.


prof. dr hab. Tomasz Gośliński