



Gdańsk, 03.09.2023 r.

### Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Mulas

**pt.: „Polimerowe nośniki fluorochinolonów - synteza, badania strukturalne, fizykochemiczne i biologiczne”**

Przedłożona do recenzji praca doktorska została wykonana przez mgr Karolinę Mulas w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej i Biomateriałów Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (WUM) pod kierunkiem prof. Marcina Sobczaka.

Jednym z poważnych problemów współczesnej medycyny jest wzrost oporności bakterii na dostępne antybiotyki czy chemioterapeutyki. Dlatego prowadzone są intensywne badania nad poszukiwaniem nowych substancjami o właściwościach przeciwbakteryjnych, ale także nad nowymi formami podania już znanych i stosowanych. W nurt tych poszukiwań bardzo dobrze wpisuje się praca Pani mgr Karoliny Mulas, przedmiotem której było otrzymanie nowych systemów dostarczania i kontrolowanego uwalniania fluorochinolonów z wykorzystaniem biodegradowalnych i/lub bioresorbowalnych polimerów oraz hydrożeli.

Recenzowana rozprawa doktorska liczy 171 stron, jest napisana w sposób standardowy i składa się z następujących rozdziałów: „Wprowadzenie i cel pracy” (2 strony), „Przegląd literatury” (55 stron), „Badania własne i dyskusja wyników” (68 stron), „Wnioski końcowe”, „Część eksperymentalna” (14 stron), „Literatura” (122 pozycje), spisy tabel i rysunków oraz streszczenia pracy w języku polskim i angielskim.

We „Wstępie” Doktorantka opisała biodegradowalne i bioresorbowalne polimery do zastosowań biomedycznych. Następnie scharakteryzowała fluorochinolony, w tym cyprofloksacynę, którą wykorzystywała w części eksperymentalnej pracy do otrzymywania koniugatów z polimerowymi nośnikami oraz do inkorporacji hydrożeli. Tą część rozprawy kończy przedstawienie wielkocząsteczkowych nośników fluorochinolonów. „Wstęp” napisany jest jasno i klarownie, w sposób zwięzły wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z tematyką pracy doktorskiej. Mankamentem tej części jest brak źródeł pochodzenia w przypadku





tabeli 3 i rysunków: 12, 14-20 (zostały skopiowane ze wspomnianej powyżej publikacji przeglądowej). Ponadto treści zamieszczone na rys. 9 powinny być podane w języku polskim.

Celem recenzowanej pracy było otrzymanie nowych, biodegradowalnych i/lub bioresorbowalnych poliuretanowych oraz poliestrowych koniugatów z cyprofloksacyną (CIP) oraz hydrożeli inkorporowanych tym chemioterapeutycznym, charakteryzujących się kontrolowaną kinetyką uwalniania substancji czynnej. Cel pracy dobrze koreluje z tytułem i treścią rozprawy doktorskiej. Metody badawcze zostały odpowiednio dobrane.

Realizację doktoratu Pani mgr Karolina Mulas rozpoczęła od syntezy i charakterystyki matryc polimerowych o ściśle założonej zdolności do biodegradacji, z wykorzystaniem nowego układu katalitycznego dietylocynk/3,4-dihydroksybenzoesan etylu (ZnEt<sub>2</sub>/EDHB), który pozwolił otrzymać z dużą wydajnością poli(ε-kaprolakton) (PCL) i polilaktyd (PLA). Zastosowany układ katalityczny jest bardziej biobezpieczny od uprzednio stosowanych w tego typu procesach polimeryzacji. Otrzymane polimery nie wykazywały toksyczności ostrej w testach Microtox® i Spirotox®. W pracy brak jest uzasadnienia dlaczego zamieszczono tylko wybrane widma NMR, MALDI-TOF MS i ich analizy (np. dla polimeru PCL: PCL-2, <sup>1</sup>H NMR; PCL-10XM, <sup>13</sup>C NMR; PCL-3M i PCL-5X MALDI-TOF MS). Moim zdaniem powinien być umieszczony komplet widm wraz z analizą przynajmniej dla polimerów, które zostały wykorzystane do otrzymywania koniugatów z cyprofloksacyną. W tej części pracy jakoś niektórych zdjęć i ich opisów budzi zastrzeżenia np. na rys. 22 i 27 brak jest opisów co przedstawiają poszczególne zdjęcia. Określenie „przykładowe mieszaniny poreakcyjne oraz oczyszczone produkty homopolimeryzacji” jest zbyt ogólne. Zakładam, że w opisanych butelkach na zdjęciach umieszczone zostały oczyszczone polimery (oznaczenia na butelkach są inne niż stosowane w pracy, a zawartość butelek jest słabo widoczna).

W drugim etapie realizacji pracy Doktorantka otrzymała poliuretanowe i poliestrowe koniugaty z cyprofloksacyną, a następnie wykazała, że profil uwalniania substancji leczniczej z koniugatów poliestrowych jest znacznie korzystniejszy niż z poliuretanowych. Cyprofloksacyna uwalniała się stopniowo, w stosunkowo długim czasie, co dobrze rokuje dla dalszych badań nad jej potencjalnym zastosowaniem w technologii średnioterminowych systemów terapeutycznych. W tej części rozprawy brakuje klucza jakim kierowała się Doktorantka przy doborze partii polimerów PCL do otrzymywania koniugatów. Nie jest jasne

dlaczego PCL-3 proces otrzymywania, którego charakteryzował się najniższą wydajnością (Tabela 9) i wartościami PE bliskimi wartości granicznej w badaniach toksyczności ostrej (test Microtox, Tabela 11) został wykorzystany do syntezy koniugatów. Brak jest również uzasadnienia dlaczego polimer PCL-3 został wykorzystany do otrzymywania koniugatów poliuretanowych CIP a z polimerów PCL-2 i PCL-3M zsyntezowano koniugaty poliestrowe? Kolejne pytanie jakie pojawia się przy czytaniu tej części rozprawy, to czy parametry nośników otrzymanych w skali pilotażowej i w zwiększonej były porównywalne i jakie były wydajności procesów? Trudne do zaakceptowania wydają się wartości  $IC_{50}$  równe zero (zamieszczone w tabeli 12) – proszę o komentarz.

W ramach kolejnego etapu pracy Doktorantka otrzymała hydrożele inkorporowane CIP, z których całkowita ilość substancji czynnej ulegała uwolnieniu w stosunkowo krótkim czasie (od kilku do kilkudziesięciu godzin). Uzyskane wyniki zachęcają do dalszych badań nad zastosowaniem wspomnianych hydrożeli w technologii krótkoterminowych systemów terapeutycznych.

W ostatnim etapie pracy Pani mgr Karolina Mulas wykonała badania mikrobiologiczne otrzymanych biomateriałów zawierających CIP (6 koniugatów poliuretanowych; 3 koniugatów poliestrowych i 1 hydrożelu) wobec *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Proteus vulgaris* ATCC 13315 i *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Największą aktywność przeciwbakteryjną wobec testowanych szczepów bakterii wykazywały koniugaty poliestrowe i hydrożel, przy czym była ona porównywalna z aktywnością CIP.

Oceniając stronę redakcyjną rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Mulas stwierdzam, że praca zawiera niezbyt liczne niefortunne określenia („po zaargonowaniu próbki”, str. 143, „metoda krzywej kalibracji” str. 142), drobne błędy językowe i literówki. Opisy syntez zamieszczonych w pracy powinny być napisane w taki sposób, aby można było jak najbardziej wiernie odtworzyć otrzymane w rozprawie wyniki. W tej kwestii mam pewne zastrzeżenia do opisów otrzymywania polimerów np. str. 143 „część próbek PLA była oczyszczana w odmienny sposób” ale nie wiadomo wobec których próbek zastosowano tą metodę.

Podsumowując, podjęta w pracy tematyka jest interesująca i aktualna. Postawione cele zostały zrealizowane. Wnioskowanie jest poparte danymi eksperymentalnymi. Niedosyt pozostawia brak odniesień w dyskusji do stanu wiedzy w literaturze.

Na uznanie zasługuje fakt, że Doktorantka wykazała się nie tylko umiejętnościami syntezy polimerów, modyfikowania ich substancjami leczniczymi, znajomością technik analizy otrzymanych produktów ale przeprowadziła również badania toksykologiczne i mikrobiologiczne (zakładam, że wykonała je samodzielnie, bo nie ma w pracy żadnych podziękowań za pomoc w ich przeprowadzeniu). Uzyskane i opisane w ramach niniejszej pracy wyniki bezsprzecznie poszerzyły wiedzę na temat biodegradowalnych polimerowych nośników cyprofloksacyny.

Uwagę zwraca bardzo mała aktywność naukowa Pani mgr Karoliny Mulas, która jest współautorem 1 publikacji przeglądowej, związanej z tematyką recenzowanej rozprawy w czasopiśmie z bazy JCR o bardzo wysokim wskaźniku IF. Na obronie doktorskiej oczekuję odniesienia się do tej kwestii.

Podsumowując moją recenzję stwierdzam, że praca zawiera elementy nowości naukowej: Doktorantka wykorzystwała nowy układ katalityczny dietylocynk/3,4-dihydroksybenzoesan etylu ( $ZnEt_2/EDHB$ ) do syntezy z dużą wydajnością PCL i PLA. Ponadto otrzymała koniugaty poliestrowe CIP oraz hydrożel zawierający ten chemioterapeutyk, które wykazywały porównywalne z CIP strefy zahamowania wzrostu względem badanych szczepów bakterii: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris* i *S. aureus*.

Uznaję, że oceniana przeze mnie praca spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (aktualne odniesienie do ustawy – Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych WUM o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Mulas do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Wojciech Kamysz