

dr hab. Joanna Masternak prof. Uczelni
 e-mail: joanna.masternak@ujk.edu.pl
 tel. 41 349 70 39

Kielce, 23 czerwca 2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt.: „*Badania powstawania kompleksów inkluzyjnych cyklodekstryn z wybranymi związkami biologicznie aktywnymi*”

autorstwa mgr Marty Biernackiej

Przedłożona do recenzji dysertacja została wykonana na Wydziale Chemicznym Uniwersytetu Łódzkiego w Zakładzie Chemii Biofizycznej pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Bartłomieja Pałeczka, promotora rozprawy oraz Pana dr Artura Stępniaaka, pełniącego funkcję promotora pomocniczego.

Zgodnie z danymi Światowej Organizacji Zdrowia choroby układu krążenia wraz z chorobami nowotworowymi są najczęstszą przyczyną śmierci. Dlatego też priorytetowe ze względów zdrowotnych są badania naukowe mające na celu zmniejszenie zapadalności i przedwczesnej umieralności osób dotkniętych tymi schorzeniami. W rozwiązywanie tych problemów, jakże ważnych z punktu widzenia społecznego, zaangażowali się ludzie nauki z takich dyscyplin jak: medycyna, farmacja, chemia czy biologia. Interdyscyplinarność prowadzonych badań zaowocowała pojawieniem się wielu nowych związków, które mogą być brane pod uwagę jako potencjalne, nowe leki. Jednakże okazało się, że nowe związki często charakteryzują się bardzo niską rozpuszczalnością w wodzie, co obniża ich walory lecznicze, gdyż ogólnie uważa się, że związki o niskiej rozpuszczalności będą wykazywać ograniczone wchłanianie w warunkach *in vivo*, a tym samym wykazywać słabą dystrybucję i transport do miejsc docelowych. W takim przypadku istotnym celem badawczym, który stanął przed współczesną nauką jest poprawa rozpuszczalności otrzymanych związków w wodzie, a tym samym zwiększenie przyswajalności, co wpłynie na poprawę skuteczności terapeutycznej potencjalnych leków. W ostatnich latach dowiedziono, że modelowanie właściwości fizykochemicznych związków o już zbadanych lub wyznaczonych *in vitro* cechach aktywności biologicznej, możliwe jest poprzez związanie potencjalnego leku w związek kompleksowy. Zgodnie z danymi literaturowymi czynnikiem kompleksującym, zwiększającym rozpuszczalność związku w wodzie czy medium biologicznym, a nie wpływającym na aktywność, mogą być cyklodekstryny (CD). Tworzący się kompleks typu gość-gospodarz, oparty jest na oddziaływaniach typu: jonowego, van der Waalsa czy wiązań wodorowych, hydrofobowego liganda z cyklodekstryną. Tak otrzymane kompleksy, nazywane również inkluzyjnymi, charakteryzują się lepszą rozpuszczalnością, stabilnością, biodostępnością

substancji aktywnej jak również cechują się lepszym smakiem. Co istotne, kompleksowanie za pomocą CD usprawnia transport substancji aktywnej do miejsca docelowego i jest procesem odwracalnym. Po podaniu doustnym lub za pomocą iniekcji, substancja aktywna jest uwalniana z kompleksu, wchłaniana do tkanek, a CD jest szybko usuwana z organizmu.

Biorąc pod uwagę powyższe aspekty, prezentowana rozprawa doktorska Pani mgr Marty Biernackiej wpisuje się w nurt ciągle aktualnych badań dotyczących opracowania kompleksów inkluzyjnych o większej rozpuszczalności substancji stosowanych w leczeniu, a tym samym ich biodostępności. W tym zakresie przedmiotem zainteresowania Autorki niniejszej pracy było zbadanie powstawania kompleksów supramolekularnych wybranych cyklodekstryn (α CD, β CD, hydroksypropylocyklodekstryny (HP β CD) oraz eteru sulfobutyłowogocyklodekstryny (SBE β CD)) z: (1) dwoma lekami jako ligandami w procesie kompleksowania, mianowicie (i) ezetymibem przeciwdziałającym chipercholesterolemii oraz (ii) lekiem hipotensyjnym - cilostazolem, jak również (2) czterema potencjalnymi cytostatykami zaliczanymi do grupy flawanonów (tj. niepodstawionego flawanonu, 4'-metoksyflawanonu, 4'-chloroflawanonu oraz 7-metoksyflawanonu).

Z formalnego punktu widzenia rozprawa liczy 150 stron, posiada strukturę typową dla prac eksperymentalnych i podzielona jest na następujące rozdziały: wprowadzenie, wstęp teoretyczny, część eksperymentalną, omówienie wyników, podsumowanie oraz bibliografię. Wprowadzenie poprzedza wykaz używanych skrótów wraz ze spisem treści. Na końcu dysertacji zamieszczono również: streszczenie w języku polskim i angielskim oraz załączniki, które zawierają dodatkowe dane zebrane w formie wykresów i tabel. Całość kończy przedstawiony dorobek naukowy Autorki.

Oceniając stronę redakcyjną i edytorską pracy stwierdzam, że napisana jest poprawną polszczyzną z niewielką liczbą niefortunnych, a czasem żargonowych sformułowań. Kilka z nich z obowiązku przytoczę: „analiza spektrum”, „procesy są sterowane entalpowo”, „mogą nanizować się więcej niż 1 molekula”. Dane zebrane w tabelach oraz przedstawiane w postaci wykresów są czytelne i dobrze opisane. Moje zastrzeżenie budzi opis osi y w języku angielskim na wykresach dotyczących badań kalorymetrycznych nad oddziaływaniami analizowanych ligandów z cyklodekstrynami (np. rys. 53, 54, 55 itd.) oraz termogramach (rys. 76, 77, 78 itd.).

W rozdziale pierwszym zatytułowanym „Wprowadzenie” Doktorantka zawarła informacje uzasadniające celowość podjętych badań, cel pracy jak również badania, które pozwoliły na zrealizowanie postawionego celu. Rozprawa zawiera bardzo syntetyczny wstęp teoretyczny, będący przeglądem literaturowym, opartym na 74 pozycjach cytowanego piśmiennictwa. W rozdziale tym Autorka charakteryzuje badane cyklodekstryny i ich pochodne, wybrane układy gość-cyklodektryna oraz ich zastosowanie. Dalej zebrane są informacje o zastosowaniu ligandów wybranych do badań, czyli leków: ezetymibu i cilostazolu oraz wybranych flawanonów. Doktorantka w celu pełnej charakterystyki obiektów badawczych przygotowała szczegółowe zestawienia zawierające: wzory sumaryczne, masy molowe, rozpuszczalności oraz temperatury topnienia. Autorka przedstawiła również szczegółową charakterystykę dwóch rozpuszczalników: wody i dimetylosulfotenu. Uważam, że na poziomie rozprawy doktorskiej podawanie tak podstawowych informacji, których znajomość jest obowiązkowa dla studentów pierwszych lat studiów obniża poziom naukowy pracy. W kolejnym rozdziale, już w części eksperymentalnej, Autorka prezentuje teoretyczne

podstawy stosowanych metod badawczych oraz metodykę prowadzonych badań. Przytacza wykorzystywaną technikę Higuchi-Connorsa tworzenia diagramów rozpuszczalności na podstawie których, oblicza stałe równowagi tworzącego się kompleksu cyklodekstryna-ligand. Następnie w oparciu o model jednego rodzaju miejsc aktywnych prezentuje parametry termodynamiczne procesu kompleksowania. Dodatkowo dla otrzymanych próbek stałych metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej charakteryzuje zachodzące przemiany fazowe oraz przedstawia identyfikację poszczególnych grup funkcyjnych metodą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Furiera. Rozdział „Omówienie wyników” to dyskusja mająca na celu porównanie uzyskanych danych dotyczących dopasowania badanych dekstryn i użytych ligandów. Autorka w tym celu na podstawie serii pomiarów spektrofotometrycznych dla wybranych mieszanin ligandów i odpowiednio: α CD, β CD, hydroksypropylo- β -cyklodekstryny (HP β CD) oraz eteru sulfobutyłowego- β -cyklodekstryny (SBE β CD), udowodniła wzrost rozpuszczalności wszystkich ligandów w wodzie. Dla badanych układów na podstawie diagramów rozpuszczalności zaproponowano tworzenie się połączeń inkluzyjnych w stosunku molowym 1:1, za wyjątkiem połączenia inkluzyjnego z cilostazolem, dla którego zaproponowano stechiometrię 1:1,5. Potwierdzeniem powstawania układów gość-gospodarz były wyznaczone stałe trwałości. Należy zaznaczyć, że w przypadku połączeń z cilostazolem nie udało się wyznaczyć eksperymentalnie ww. stałych. Najsilniejszy efekt solubilizacji zaobserwowano w przypadku zastosowania sulfabutyłowej pochodnej β CD dla ezetymibu oraz cilostazolu. Wszystkie flawanony również zwiększały swą rozpuszczalność w roztworze wodnym po dodaniu czynnika kompleksującego, czyli odpowiedniej cyklodekstryny. Co ciekawe w przypadku związków z grupy flawanonów to β CD okazała się najlepszym czynnikiem kompleksującym, który jednocześnie najefektywniej zwiększał rozpuszczalność tej grupy ligandów. Efekty energetyczne towarzyszące procesom kompleksowania zostały wyznaczone w oparciu o izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne (ITC). Na podstawie wyznaczonych efektów termodynamicznych, takich jak: zmiany molowych entalpii, entropii oraz entalpii swobodnych, dla prawie każdego z powyższych układów stwierdzono, że procesy tworzenia kompleksów inkluzyjnych są egzotermiczne i przebiegają samorzutnie. Doktorantka potwierdziła również stechiometrię tworzących się połączeń za pomocą metody UV-Vis, a w przypadku cilostazolu wyjaśniła, że przyczyną stosunku 1:1,5 może być tworzenie się mieszaniny kompleksów o stosunku molowym, odpowiednio 1:1 i 1:2. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka zdecydowała się na analizę, otrzymanych metodą współrozpuszczania, produktów kompleksowania w fazie stałej. Niestety przedstawione w pracy widma FT-IR, dodatkowo w zawężonym zakresie od 1900 do 400 cm^{-1} , nie są zbyt czytelne, co utrudnia weryfikację otrzymanych wyników. Nie mniej jednak, moim zdaniem analiza poszczególnych pasm została wykonana prawidłowo o czym świadczy również publikacja danych eksperymentalnych dla ezetymibu w czasopiśmie *Int. J. Mol. Sci.*, którego współautorem jest Doktorantka. W przypadku widm FT-IR dla kompleksów z flawanonami Doktorantka nie przedstawiła analizy otrzymanych widm i nie przypisała pasm poszczególnym grupom funkcyjnym. Pomiarzy metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej pozwoliły Autorce rozprawy wysunąć jednoznaczne wnioski potwierdzające utworzenie kompleksów inkluzyjnych w fazie stałej. Parametrem wskazującym na powyższy proces było przesunięcie

pasma dekompozycji/topnienia w kierunku wyższych temperatur i dodatkowo ich charakterystyczne rozmycie.

Doktorantka dysertację kończy zwięzłym podsumowaniem osiągniętych rezultatów oraz jeszcze bardziej syntetycznym streszczeniem w języku polskim i angielskim. W zamieszczonych na końcu rozprawy „Załącznikach” Doktorantka umieściła dodatkowe dane eksperymentalne do których odnosi się w części „Omówienie wyników”, co znacznie ułatwia czytanie pracy. Bibliografia, cytowana w części pracy moim zdaniem jest dobrana prawidłowo, ale mam zastrzeżenia do pozycji z zakresu 74-83, które odnoszą się do badań fizykochemicznych nad modelami sieci połączeń cząsteczek wody, która to tematyka nie stanowi badań wchodzących w zakres prezentowanej pracy doktorskiej. Pracę kończy zebrany dorobek naukowy mgr Marty Biernackiej, w którym należy zauważyć jeden artykuł w czasopiśmie z listy JCR bezpośrednio związany z recenzowaną rozprawą doktorską, 3 artykuły niepowiązane z pracą oraz udział w 14 konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym.

Biorąc pod uwagę całokształt przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej do najważniejszych osiągnięć pracy, stanowiących element nowości naukowej zaliczyć należy:

- i) scharakteryzowanie pod kątem termodynamicznym i stechiometrycznym połączeń typu gość-gospodarz dla wybranych substancji leczniczych oraz potencjalnych chemioterapeutyków,
- ii) wyizolowanie w fazie stałej metodą współrozpuszczania wszystkich kompleksów inkluzyjnych,
- iii) próbę analizy widm FT-IR oraz termogramów DSC, potwierdzających odpowiednio zajście procesu samoistnej inkluzji ligandów do wnęki wybranych cyklodekstryn oraz zwiększonej trwałości termicznej powstałych kompleksów inkluzyjnych.

Mając na uwadze powyższe w mojej ocenie postawione przez Doktorantkę cele pracy zostały osiągnięte. Zastosowane metody badawcze oraz opracowanie wyników świadczy o wiedzy, umiejętnościach i zaangażowaniu Pani Marty Biernackiej w badaniach nad poszukiwaniem potencjalnych solubilizatorów dla wybranych ligandów. W trakcie obrony poproszę Doktorantkę o wyjaśnienie następujących kwestii, które nasunęły się w trakcie czytania niniejszej dysertacji:

- i) w przeglądzie literaturowym brakuje fragmentu dotyczącego stanu wiedzy na temat wcześniej prowadzonych badań nad zwiększeniem rozpuszczalności dla substancji obniżających zawartość cholesterolu, być może hipotensyjnych lub antynowotworowych, czy w literaturze takie dane można znaleźć, a jeśli tak to jakie wnioski z nich płyną?
- ii) czy flawanon jest potencjalną substancją cytotoksyczną? oraz czy badane podstawione flawanony charakteryzują się brakiem toksyczności wobec komórek prawidłowych?
- iii) czy dla wyizolowanych w fazie stałej kompleksów inkluzyjnych przeprowadzono badania potwierdzające czystość, a także skład produktu? Jeśli nie jak należałoby to sprawdzić?
- iv) dlaczego w przypadku grupy flawanonów w badaniach nie wzięto pod uwagę SBE β CD, która charakteryzuje się największym potencjałem jeśli chodzi o zwiększenie rozpuszczalności ligandów?

- v) według mnie z przeglądu literaturowego wynika, że pracę bardzo wzbogaciłyby badania technikami NMR i ESI MS, które nie zostały zamieszczone w publikacji *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 455, chociaż są przytoczone w publikacji. Proszę o wyjaśnienie tej kwestii?
- vi) czy Doktorantka mogłaby przedstawić analizę widm FT-IR dla kompleksów dekstryna-flawonony.

Podsumowując uważam, że wyniki uzyskane przez Panią mgr Martę Biernacką w ramach prezentowanej dysertacji doktorskiej wpisują się w aktualnie intensywnie prowadzone badania nad poszukiwaniem leków związanych z chorobami układu krążenia, gdyż poszerzają wiedzę w zakresie nowych układów inkluzyjnych potencjalnie zwiększających efektywność działania substancji trudno rozpuszczalnych w wodzie. Biorąc pod uwagę umiejętności, zaangażowanie i nabyte doświadczenie Doktorantki stwierdzam, że przedstawiona do recenzji dysertacja doktorska mgr Marty Biernackiej w pełni spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 186 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.) i w związku z tym wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki chemiczne o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Marty Biernackiej i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Łącząc wyrazy szacunku


.....

dr hab. Joanna Masternak prof. Uczelni