Warszawa, 10.10.2015

Prof. nzw. dr hab. inż. Wojciech Święszkowski
Wydział Inżynierii Materiałowej
Politechnika Warszawska

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Gajowy

pt.: „**Biodegradowalne kopolimery amfifilowe zawierające naturalnie bioaktywne składniki dla projektowania nowoczesnych materiałów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej**"

1. Tematyka rozprawy

Wraz z rozwojem technologii materiałów polimerowych, inżynierii materiałowej i nanotechnologii pojawiły się możliwości wywarzania i charakteryzowania materiałów o szczególnych właściwościach, dzięki którym znajdują one coraz szersze zastosowanie w medycynie. Stanowią one podstawę do tworzenia nowych metod terapeutycznych dostosowanych do potrzeb każdego pacjenta; począwszy od materiałów na implanty ortopedyczne tworzonych "na miarę" , aż po nowe substancje używane do produkcji leków. Ich stosowanie zwiększa przede wszystkim skuteczność leczenia. Między innymi wydłuża okres prawidłowego funkcjonowania implantów, czy też z powodzeniem umożliwia leczenie infekcji i chorób nowotworowych.

Mimo tych osiągnięć oraz podwyższonych standardów leczniczych zakażenia szpitalne nadal są przyczyną powikłań pooperacyjnych, przedłużających hospitalizacji, a nawet śmierci pacjenta. Każda rana, nawet najmniejsza, stanowi źródło zakażeń, których przyczyną są drobnoustroje tj. bakterie, grzyby czy wirusy. Stosowana wówczas ogólnoustrojowa terapia antybiotykowa jest często nieskuteczna. Dlatego wskazanym jest dostarczenie czynnika aktywnego

bezpośrednio do miejsca zakażenia lub potencjalnego jego wystąpienia. Wymaga to opracowania właściwego nośnika, który nie tylko „doprowadzi" czynnik aktywny do miejsca leczenia, lecz będzie go dawkował aż do całkowitego wyleczenia zakażenia. Miejscowe leczenie ma szczególne znaczenie w przypadku leczenia chorych onkologicznych. Celowana terapia wspomaga proces leczenia, zwiększa efekt terapeutyczny oraz zmniejsza skutki uboczne terapii przeciwnowotworowej poprzez dostarczenie leku bezpośrednio do komórek nowotworowych.

Prace na takimi „inteligentnymi systemami dostarczania leków" (ang. Drug Delivery Systems, DDS) od wielu lat prowadzone są w wielu ośrodkach naukowych na świecie, wśród których jest również grupa Pani Profesor El Fray. Prace badawcze koncentrują się przede wszystkim na opracowaniu nośników, które obok substancji czynnej, stanowią niezmiernie istotny element terapii celowanej. Zarówno poszukuje się nowych materiałów na nośniki jak również opracowuje się coraz to nowsze formy takich nośników.

Do wytwarzania DDS, oprócz nielicznych substancji nieorganicznych, stosuje się głównie materiały polimerowe, które w środowisku organizmu człowieka ulegają biodegradacji. Poliestry tj. polilaktyd (PLA) i poliglikolid (PGA) i ich kopolimery, ze względu na biozgodność oraz możliwość sterowania szybkością biodegradacji są jednymi z najczęściej badanych polimerów w kontekście zastosowania ich do produkcji nośników leków. Inną interesującą grupą materiałów są polimery amfifilowe, które składają się z makrocząsteczek zawierających obok segmentów hydrofobowych także ugrupowania hydrofilowe. Ze względu na swoją budowę w środowisku wodnym wykazują one zdolność do samoorganizacji i formowania różnych trójwymiarowych struktur. Zdolność tą między innymi wykazują naturalne cząsteczki tj. lipidy, peptydy czy białka. Na przykład, lipidy w odpowiednim środowisku rozpuszczalników są w stanie zorganizować się , tworząc strukturę 3D o budowie rdzeń-otoczka zwaną liposomem. Właśnie ta zdolność materiałów amfifilowych może być wykorzystana do enkapsulacji leków i tym samym do wytwarzania DDS. Stało się to motywacją do podjęcia badań nad wytwarzaniem nośników leków z różnych polimerów o właściwościach amfifilowych tj. PEG-PLGA, PEG-PCL, etc.. Materiały te w zależność od warunków samoorganizacji mogą tworzyć mikro- i nano-sfery lub kapsułki, micele, czy polimersomy, zamykając w swojej strukturze czynniki biologicznie czynne.

W świetle tych rozważań można stwierdzić, że tematyka pracy, która dotyczy opracowania nowych, biodegradowalnych polimerów amfifilowych bardzo dobrze wpisuje się w obecne trendy badań naukowych, których celem jest wytwarzanie nowych systemów dostarczania leków opartych na zastosowaniu związków amfifilowych jako nośników czynników biologicznie czynnych. Dodatkowo celowe jest zaproponowane w pracy wzbogacenia materiału w składniki o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, wzmacniając tym samym skuteczność leczenia.

2. Struktura, cel i zakres pracy

Recenzowana praca napisana jest w języku polskim. Praca jest obszerna i z dodatkami liczy 160 stron. Składa się z 7 głównych rozdziałów, które są podzielone na podrozdziały. Zakończona jest bogatą bibliografią, zawierającą 192 pozycji literaturowych, ściśle związanych z tematyką rozprawy, wśród których są także publikacje mgr. Joanny Gajowy. Praca jest bogata w ilustracje. Zawiera 73 rysunki oraz 17 tabel. Układ pracy jest poprawny i logiczny, zachowujący właściwą proporcję części wprowadzającej do tematu (literaturowej) i części badań własnych (doświadczalnej).

Rozdział I, Wprowadzenie, opisuje genezę pracy oraz główny przedmiot badań podjętych w rozprawie.

Rozdział II zawiera aktualny stan wiedzy w tematyce rozprawy przygotowany na podstawie przeglądu literaturowego. Autorka w sposób właściwy i wyczerpujący przedstawia dotychczasowe osiągnięcia w zakresie polimerów amfifilowych, oraz ich zastosowania do tworzenia nośników leków. Opisuje proces samoorganizacji oraz różne formy, które w tym procesie mogą powstać. Wskazuje również obecne kierunki rozwoju systemów dostarczania leków - DDS.

W dwóch kolejnych rozdziałach Autorka definiuje cele oraz zakres pracy. Głównym celem było (s.47 cytat) *„opracowanie technologii wytwarzania oraz ocena właściwości nowych biodegradowalnych, amfifilowych kopolimerów o potencjalnym wykorzystaniu w technikach medycznych, głównie jako nośniki substancji biologicznie aktywnych, w tym o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych”.* Drugim, definiowany przez Autorkę celem poznawczym było zbadanie i opisanie zjawisk zachodzących w procesie samoorganizacji. Ponadto utylitarnym celem było wskazanie przydatności opracowanych polimerów do tworzenia nowych systemów

dostarczania leków. Cele pracy sformułowano poprawnie. W pracy nie postawiono żadnej tezy.

Rozdział V zawiera opis części doświadczalnej. Autorka opisuje użyte do syntezy surowce i substancje pomocnicze oraz zastosowane metody syntezy dwóch materiałów polimerowych z udziałem dimeryzowanego kwasu tłuszczowego (DLA): czwartorzędowych soli aminowych (DLA-EDA-Tyr) oraz kopolimerów amfifilowych zawierających DLA, różne pochodne tyrozyny (DTR) oraz poli(glikol etylenowy) o różnej masie molowej.

Na podkreślenie zasługuje zaproponowana i zrealizowana metodyka badań właściwości otrzymanych materiałów polimerowych. Obejmowała ona szeroki program badawczy, m.in. szczegółowe badania budowy chemicznej (spektroskopię w podczerwieni FTiR, spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego 1H NMR), oznaczanie masy cząsteczkowej metodą chromatografii żelowej (GPC), badania kalorymetryczne DSC. Otrzymane materiały polimerowe poddano również testom degradacji hydrolitycznej oaz oceniano ich aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec bakterii (*S.aureus E.coli* i *S.epidermidis*) oraz grzybów (*C.albicans*).

Cennym elementem rozprawy jest część metodyki opisująca wytwarzanie mikrosfer i nanosfer zawierających odpowiednio antybiotyki i leki antynowotworowe. Otrzymane sfery przebadane zostały pod kątem oceny ich morfologii, rozmiarów oraz uwalniania substancji aktywnej.

W kolejnym rozdziale, który jest najobszerniejszą częścią rozprawy, Autorka prezentuje wyniki przeprowadzonych badań biodegradowalnych kopolimerów amfifilowych zawierających bioaktywne składniki . Dyskusja uzyskanych rezultatów zawiera również ich odniesienie do wyników publikowanych przez innych badawczy, co świadczy o dojrzałości naukowej mgr. Joanny Gajowy.

Właściwą część rozprawy doktorskiej kończy rozdział zawierający podsumowanie przeprowadzonych badań oraz płynące z nich główne wnioski .

3. Ocena merytoryczna i uwagi krytyczne

Jak już wcześniej nadmieniono tematyka rozprawy jest aktualna i ważna, zarówno z punktu widzenia zdobywania nowej wiedzy jak i praktycznego zastosowania wyników badań. Znakomicie wpisuje się w nowoczesne kierunki badań w obszarach nanotechnologii, inżynierii biomateriałów i technologii materiałów polimerowych.

Prezentowana rozprawa jest dobrym przykładem pracy eksperymentalnej, która zawiera zarówno syntezę nowych materiałów, ich pełną charakterystykę, jak też próbę użycia nowo opracowanych biomateriałów do wykonania wyrobu medycznego – systemu dostarczania leków, oraz sprawdzenie jego działania tzw. „proof of concept". Zaplanowany bardzo ambitny program badań został w pełni zrealizowany. Autorka wykazała się wiedzą i umiejętnościami w zakresie syntezy kopolimerów na bazie dimeryzowanego kwasu tłuszczowego i ich dokładnej charakteryzacji z zastosowaniem zawansowanych technik badawczych, co podnosi znacząco poziom naukowy rozprawy. Opracowała metodę wytwarzania amfifilowych kopolimerów blokowych poli(alifatyczno/aromatycznych estro-amido-eterów, PAAEAE) o dwóch liczbowo średnich masach cząsteczkowych (35kDa i 21 kDa), co jest największym osiągnięciem w pracy. Badania kalorymetryczne DSC wykazały, że wprowadzenie struktury oligoestrów PEG powoduje obniżenie temperatury topnienia oraz spadek krystaliczności. Podobne zachowanie kopolimerów amfifilowych obserwowali inni badacze. Budowa chemiczna i większościowy udział fazy amorficznej powodował wysoką około 30% absorbcję roztworu SBF. Ponadto w wyniku degradacji powstawały produkty zasadowe zwiększające pH do 7.9. Na podkreślenie zasługują nie opisywane dotychczas w literaturze przedmiotu wyniki badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej materiałów polimerowych zawierających dimer kwasu tłuszczowego. Szybsza dyfuzja DLA z kopolimeru zwiększała jego aktywność bakteriobójczą. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe potwierdzono również dla mikrosfer zawierających antybiotyki. Potwierdza to osiągnięcie zamierzonego głównego celu projektu.

Istotnym wynikiem prac Autorki było otrzymanie nanosfer o różnej wielkości w zależności od użytego do ich wytworzenia polimeru oraz jego odziaływania z hydrofobowym/hydrofilowym lekiem. Dodatek hydrofobowej doksorubicyny skutkował formowaniem większych cząstek niż w przypadku, gdy zamykano w cząstkach karboplatynę. Analizując profile uwalania leków antynowotworowych uzyskano najkorzystniejsze rezultaty dla kompolimerów DTE-DLA-PEG2000/mPEG5000. Otrzymane systemy uwalniają doksorubicynę znacznie wolniej, niż inne polimerowe nośniki opisywane w literaturze przy porównywalnej efektywności enkapsulacji. Jest to istotne osiągnięcie Autorki, które pozwala stwierdzić, że otrzymane przez Nią materiały polimerowe mogą stanowić dobrą alternatywę dla obecnych biomateriałów stosowanych na systemy dostarczania leków.

Na podkreślenie zasługuje także fakt, że część badań Autorka zrealizowała podczas stażu w znanym ośrodku naukowym w USA, zdobywając tym samym istotne dla jej kariery naukowej doświadczenie.

Czytając pracę nasuwają się pewne uwagi krytyczne i pytania:

1) Temat pracy nie do końca odzwierciedla obszerny zakres prac badawczych. W pracy oprócz nowoczesnych materiałów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej opracowano również nośniki leków antynowotworowych.
2) Brak jest wyraźnie zdefiniowanych założeń jakie cechy powinny posiadać nowoczesne materiały o aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz nośniki leków antynowotworowych.
3) Brakuje badań biologicznych oceniających biozgodność opracowanych materiałów.
4) W przypadku potencjalnych zastosowań opracowanych polimerów np. jako pokrycia antybakteryjne należałoby wyznaczyć ich właściwości mechaniczne.
5) Czasy przeprowadzonych badań degradacji (14dni) i uwalniania leków (12 dni) wydają się zbyt krótkie. Jakie były przesłanki do skrócenia tych badań?
6) Rozkłady nanocząstek prezentowane w tabeli 15 i wykresach 67-69 nie są spójne. Ponadto w przypadku zamykania doksorubicyny widoczny jest bimodalny charakter rozkładu. Skąd to wynika? Czy z tendencji do aglomeracji nanocząstek?
7) Wielkość otrzymanych nanocząstek prezentowana na wykresach i zdjęciach z TEM przekracza często przyjmowane w literaturze optymalne rozmiary dla terapii antynowotworowej. Czy jest więc szansa na otrzymanie nanocząstek o mniejszych średnicach?
8) W tabeli 12 i 13 podano procent zahamowania wzrost bakterii oraz procent żywych bakterii przez polimerowe mikrosfery. Co oznacza 66% zahamowania i 6% żywych bakterii w czasie 0h? I dlaczego te procentu utrzymują się w kolejnych punktach pomiarowych?
9) Dlaczego na Rys. 75 model obrazujący kinetykę pierwszego rzędu w przyjętym układzie współrzędnych nie jest linią prostą?

10) Stwierdzenie ze strony 131, że na podstawie danych R^2 z tab. 16 najlepsze dopasowanie profilu uwalniania KPt z nanonośników otrzymano dla modelu kinetyki pierwszego rzędu jest zastanawiające biorąc pod uwagę zbieżność R^2 dla wielu modeli?
11) W pracy brakuje pełnej analizy statystycznej wyników. Autorka często podaje, że wielkości różnią się znacząco dla dwóch różnych materiałów, jednak nie podaje na jakim poziomie istotności było to wyznaczone.

Biorąc pod uwagę stronę edytorską pracy, stwierdzam, że praca napisana jest starannie oraz poprawnie pod względem językowym. Autorka nie ustrzegła się jednak drobnych błędów np.

- na str. 32 brakuje dokończenia zdania: cyt. „... skutkuje tworzeniem się [76].."
- na str. 39 i 109 powinno być „i inni" a nie „et al.,"
- na str. 46, to jeszcze „cześć literaturowa" a nie „Cel i zakres pracy"
- na str. 60, powinno być: „Proces był prowadzony w pięciu etapach"
- na Rys. 62, brakuje oznaczeń P1, P2 etc.
- na str. 69, powinno być mikroskopii świetlnej.

Chcę podkreślić jednak, że powyższe uwagi do dyskusji oraz usterki językowe nie obniżają mojej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Gajowy. Autorka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną oraz praktyczną z zakresu wytwarzania i charakteryzowania polimerów amfifilowych. Na uwagę zasługują umiejętności Autorki dotyczące planowania i realizacji badań eksperymentalnych. Wielowątkowość problematyki badawczej wymagała od Doktorantki wykorzystania szeregu nowoczesnych metod i urządzeń badawczych (tj. FTiR, NMR, DSC, TEM i złożone badania biologiczne). W konsekwencji badań, opracowała metodę wytwarzania biodegradowalnych amfifilowych kopolimerów blokowych poli(alifatyczno/aromatycznych estro-amido-eterów, PAAEAE), które potencjalnie mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w medycynie jako materiały na nośniki leków. To jeden z elementów nowatorskich w tej pracy, który wart jest podkreślenia.

Podsumowując stwierdzam, że opiniowana rozprawa doktorska posiada wiele aspektów poznawczych i stanowi oryginalny wkład Autorki w rozwój dziedziny

biomateriałów, w szczególności wytwarzania i charakteryzowania nowych polimerów amfifilowych oraz otrzymywanych na ich bazie mikro- i nano-nośników leków.

4. Wniosek końcowy

Uwzględniając powyższą opinię, uważam, że rozprawa Pani mgr inż. Joanny Gajowy pt.: „**Biodegradowalne kopolimery amfifilowe zawierające naturalnie bioaktywne składniki dla projektowania nowoczesnych materiałów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej**", spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim zgodnie z Ustawą o Stopniach Naukowych i Tytułach Naukowych z dnia 14.03.2003r. i może być dopuszczona do publicznej obrony.