dr hab. inż. Agnieszka Kowalczyk, prof. ZUT
Katedra Technologii Chemicznej Organicznej
i Materiałów Polimerowych
Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
70-322 Szczecin, ul. Pułaskiego 10
E-mail: Agnieszka.Kowalczyk@zut.edu.pl, tel. (91) 449 46 84

Szczecin 15.07.2022 r.

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Sonii Kudłacik-Kramarczyk
pt.: „Biokompatybilne układy transdermalne i ich zastosowanie w terapii nowotworowej"

Wybór i aktualność tematyki badawczej

Mgr inż. Sonia Kudłacik-Kramarczyk wykonała rozprawę doktorską na Wydziale Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej pod kierunkiem dr hab. inż. Bożeny Tyliszczak, prof. PK oraz dr n. biol. lek. Med. Magdaleny Kędzierskiej jako promotora pomocniczego. Celem rozprawy było opracowanie biokompatybilnych układów transdermalnych na bazie chitozanu, modyfikowanych aloesem oraz cząstkami albuminowymi z lekiem przeciwnowotworowym. Ostatecznie układy te były materiałami hydrożelowymi zaliczanymi do nowoczesnych opatrunków medycznych.

Nowe rozwiązania dla medycyny są niezwykle istotnymi zagadnieniami, poruszanymi w wielu dziedzinach nauki, w tym w dyscyplinie inżynieria chemiczna. W ten światowy trend wpisuje się także technologia otrzymywania nowej generacji opatrunków hydrożelowych z biopolimerów, mających cechę szczególną w postaci kontrolowanego i z założenia bezpiecznego sposobu podaży leków chorym przez skórę. Wiadomo bowiem, że kwestie zdrowia i życia człowieka są nadrzędne nad innymi i zawsze będą w centrum uwagi. W recenzowanej rozprawie doktorskiej poruszono trzy zasadnicze problemy. Pierwszy to wytwarzanie materiałów hydrożelowych z biopolimeru, drugi- zastosowanie w tym celu szybkiej i proekologicznej metody, tj. fotopolimeryzacji, trzeci to- modyfikacja materiałów polimerowych substancjami naturalnymi (sok z aloesu) i chemicznymi (lek przeciwnowotworowy) w celu uzyskanie materiału wielofunkcyjnego (tj. opatrunku o działaniu lecząco-kojącym). Ponadto warte podkreślenia jest, że Autorka obrała za cel szczególnie często występujący rodzaj choroby, tj. nowotwór piersi, który potwierdziła w części literaturowej rozprawy doktorskiej aktualnymi statystykami medycznymi.

SEKRETARIAT WIITCh
Wpłynęło dnia 21.07.2022
L.Dz. 1107

Tak więc tematyka pracy doktorskiej wpisuje się w aktualny nurt badań naukowych prowadzonych w obszarze technologii i inżynierii materiałów polimerowych oraz inżynierii biomedycznej.

Nadrzędnym celem badań było wykazanie działania przeciwnowotworowego opatrunku hydrożelowego. Zakres prac obejmował syntezę i charakterystykę matryc hydrożelowych na bazie chitozanu z użyciem dwóch środków sieciujących, ich modyfikację fizyczną sokiem z aloesu, otrzymywanie białkowego nośnika leku przeciwnowotworowego oraz otrzymanie i charakterystykę właściwości fizykochemicznych, sorpcyjnych a także właściwości cytotoksycznych i w końcu przeciwnowotworowych gotowych opatrunków. Istotne jest, iż w pracy oprócz licznych metod i technik analitycznych przypisanych do technologii chemicznej i inżynierii materiałowej (tj. spektroskopia w podczerwieni, spektroskopia UV-Vis, spektroskopia Ramana, transmisyjna mikroskopia elektronowa, skaningowa mikroskopia elektronowa, dyfrakcja rentgenowska, analiza metodą dynamicznego rozpraszania światła, badanie zwilżalności powierzchni czy właściwości mechanicznych materiałów polimerowych) zastosowano także analizę biologiczną otrzymanych materiałów (tj. badania cytotoksyczności, aktywności prozapalnej czy aktywności hemolitycznej).

Wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej zostały opublikowane w sześciu współautorskich artykułach w czasopismach naukowych z wysokim wskaźnikiem IF (*Materials, Materials Science and Engineering, Journal of Biomedical Materials* i *Przemysł Chemiczny*) a także zaprezentowane w formie referatów (18) i posterów (80) na konferencjach krajowych oraz zagranicznych. Ponadto jest współautorką 26 publikacji niezwiązanych bezpośrednio z tematyką pracy doktorskie. Należy podkreślić, że za swoje osiągnięcia Doktorantka została uhonorowana różnymi medalami, w tym złotymi, na międzynarodowych wystawach wynalazków oraz stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców. W dorobku naukowym Autorki nie przedstawiono jednak informacji o zgłoszeniach patentowych czy uzyskanych patentach. Niemniej całość dorobku naukowego Doktorantki świadczy o jej dużej aktywności naukowej.

Omówienie i ocena merytoryczna

Praca doktorska (łącznie 205 stron) obejmuje Część literaturową (51 str.) oraz Część badawczą (118 str.), a także Spis literatury oraz Wykaz osiągnięć naukowych Autorki. W części literaturowej zawarto obszerny wstęp w formie dwóch podrozdziałów zatytułowanych „Problematyka badawcza" i „Znaczenie podejmowanej problematyki

badawczej" (razem 12 stron), a następnie Cel i zakres pracy (3 strony). Natomiast w spisie treści nie wyodrębniono dwóch głównych części (tj. literaturowej i badawczej). Zawarty w tej części pracy Cel i jej zakres mógłby być jednak napisany w sposób bardziej zwięzły.

W części literaturowej Autorka skoncentrowała się na przedstawieniu problemu badawczego, tj. wysokiej zachorowalności na raka piersi i rozwiązaniach w obrębie leczenia, głównie z zastosowaniem układów transdermalnych. Wiadomości przedstawione w tej części pracy poparto jedynie czterema publikacjami, jest to mała liczba biorąc pod uwagę ogólną liczbę źródeł literaturowych (aż 265 poz.). Pozostała część przeglądu literatury zawiera informacje o nośnikach substancji aktywnych, materiałach hydrożelowych, chitozanie i aloesie. Pewien niedosyt budzi brak przedstawienia aktualnych badań nad modyfikacją chemiczną i fizyczną chitozanu oraz szczególnie o procesie fotopolimeryzacji jego pochodnych. Nie przedstawiono też w jakim zakresie na świecie prowadzone są badania and układami hydrożel chitozanowy-albumina-lek przeciwnotowtorowy. Jest to mimo to dobrze opracowany przegląd literatury, oparty na 214 pozycjach literatury obejmujący okres od 1973 roku, ale zdecydowana większość to artykuły naukowe o ostatniej dekad. Jednak one w ogólne nie są wykorzystane w dyskusji opisującej i komentującej wyniki pracy, we wspomnianej części pracy Autorka posługuje się kolejnymi źródłami literaturowymi (51 poz.).

W części doświadczalnej Autorka wykazała się umiejętnością planowania eksperymentów, znajomością wielu technik instrumentalnych stosowanych w badaniu materiałów polimerowych, ale także umiejętnością przeprowadzenia analiz biologicznych opracowanych hydrożeli. Dobór materiałów i metod badawczych generalnie nie budzi zastrzeżeń, jak również sposób przedstawienia wyników i ich interpretacja. Z obowiązku recenzenta zwracam jednak uwagę na pewne mankamenty, mianowicie: stosowanie terminu „czynnik sieciujący" (chociaż spotykane w polskojęzycznej literaturze) jest nieprawidłowe w odniesieniu do użycia związków chemicznych, powinno się zastosować nazwę „środek sieciujący". Współczynnik pęcznienia jest liczbą bezwymiarową więc nie powinien być podawany w [g/g] (na rys. 30 i dalszej części pracy). Wspomniany rys.30 lepiej pokazywałby różnice we współczynniku pęcznienia gdyby zmienić skalę osi Y.

Zasadnicze wyniki poznawcze przeprowadzonych badań można zrekapitulować następująco:

- Na podstawowe właściwości niemodyfikowanych materiałów hydrożelowych na bazie chitozanu, takie jak stopień pęcznienia, hydrofilowość oraz wytrzymałość na zerwanie wpływ ma średni ciężar cząsteczkowy użytego środka sieciującego. W pracy stosowano tylko jeden rodzaj środka sieciującego, tj. diakrylan poli(glikolu etylenowego)

(PEGDA) w dwóch odmianach różniących się średnim ciężarem cząsteczkowym. Wykazano, że lepszy jest ten o wyższym średnim ciężarze cząsteczkowym;

- Modyfikacja fizyczna materiałów hydrożelowych sokiem z aloesu pozwala na uzyskanie hydrożeli o nieco wyższej pojemności sorpcyjnej i hydrofilowości, ale zmniejszonej wytrzymałości na rozciąganie, przy czym dowiedziono, iż nie wykazują one aktywności prozalapnej w stosunku do skóry ludzkiej. Ponadto udowodniono, że sok z aloesu uwalnia się efektywniej z opatrunku hydrożelowego w środowisku kwaśnym;
- Proces otrzymywania białkowych nośników substancji lekowych jest silnie uzależniony od rodzaju środka wysalającego, pH rozpuszczalnika białka oraz stężenia albuminy, a także od sposobu mieszania reagentów. Wykazano, że w przypadku roztworów albuminy o stężeniu 4g/l oraz 8g/l najefektywniejszym środkiem wysalającym jest 2M r-r K_3PO_4, a otrzymane w tym układzie nośniki leków nie wykazują cytotoksyczności względem linii normalnych fibroblastów skórnych ani właściwości hemolitycznych;
- Dowiedziono działania cytotoksycznego względem linii komórkowej gruczolaka piersi MCF-7 dla otrzymanych układów hydrożelowych na bazie chitozanu, modyfikowanych sokiem z aloesu i odpowiednim lekiem przeciwnowotworowym.

Pod względem edytorskim rozprawa opracowana jest dobrze napisana, chociaż zdaniem recenzenta rysunki powinny być umieszczane w całości na jednej stronie, a podpisy pod rysunkami mogłyby być napisane mniejszą czcionką niż tekst główny pracy. Natomiast błędy stylistyczne i językowe są nieliczne.

Lektura pracy doktorskiej pozwala na sformułowanie kilku pytań i krytycznych uwag merytorycznych.

1. W podrozdziale 10.1. Metodologia otrzymywania materiałów hydrożelowych napisano, iż dodawano „odpowiednią ilość fotoinicjatora", z Tabeli 3. dowiadujemy się, że stosowano 0,5 ml fotoinicjatora. W jaki sposób dobrano ilość fotoinicjatora? Czy testowano inne fotoinicjatory? Czy wykonywano badania metodą foto-DSC? Jaka była grubość naświetlanych warstw? Ze spisu wystąpień konferencyjnych wiadomo, że na jednej z nich Autorka przedstawiała wpływ ilości fotoinicjatora na właściwości i strukturę matrycy hydrożelowej, dlaczego więc te wyniki nie znalazły się w pracy? Czy badano także wpływ innych czynników jak wartość irradiancji promieniowania UV czy czas naświetlania?

2. W części literaturowej nie zawarto informacji o modyfikacji chemicznej chitozanu celem możliwości jego fotopolimeryzacji. Na s. 93 Autorka pisze, iż grupy wodorotlenowe i aminowe z chitozanu reagują z innymi grupami funkcyjnymi tworząc sieć polimerową. Według Autorki zanik pasm dla grupy wodorotlenowej i aminowej w usieciowanych materiałach hydrożelowych świadczy o „poprawnym przebiegu procesu sieciowania", co poparte jest poz. literaturową 232. Ten artykuł nie odnosi się jednak do procesu fotosieciowania chitozanu. Proszę o wyjaśnienie, czy wg Autorki grupy te biorą udział w fotopolimeryzacji diakrylanu poli(glikolu etylenowego)? Dlaczego w interpretacji widm FTIR (s.90) nie ma informacji o (nie)obecności wiązań nienasyconych pochodzących od środka sieciującego? Czy rzeczywiście warunki fotopolimeryzacji zostały tak dobrane, że ulegają one pełnej konwersji?
3. Czy wiadomo coś Autorce o wpływie promieniowania UV-A na stosowany w pracy lek przeciwnowotworowy? Według przedstawionej preparatyki materiałów hydrożelowych, zawiesiny sfer albuminowych inkorporowanych lekiem były naświetlane promieniowaniem UV-A na etapie przygotowania opatrunku.
4. Trudno zgodzić się ze stwierdzeniem, że fotopolimeryzacja „polega na sieciowaniu materiału poprzez absorpcję promieniowania widzialnego i ultrafioletowego, w efekcie czego dochodzi do dysocjacji wiązań podwójnych (s.40). O sieciowaniu można mówić jedynie wtedy, gdy w reakcji biorą monomery wielofunkcyjne. Wystarcza absorpcja promieniowania widzialnego lub ultrafioletowego. W efekcie absorpcji promieniowania dochodzi do wzbudzenia i fotolizy fotoinicjatora, a tylko w szczególnych/rzadkich przypadkach do dysocjacji wiązań podwójnych bez udziału fotoinicjatora.
5. Na s. 138 przedstawiono wyniki oznaczeń szybkości uwalnia solu z aloesu z matrycy polimerowej. Wątpliwości budzi sposób przeprowadzenia tych oznaczeń. Po poborze próbki do miareczkowania do układu dodawano 3 ml świeżego roztworu, celem zachowania stałej objętości mieszaniny, ale przez to go rozcieńczano. Jak interpretować więc wyniki przedstawione na rys. 66. Czy po 10h nie powinno się spodziewać ok. 100% uwolnionej substancji? Z wykresu wynika, że tylko kilka procent. Zdaniem recenzenta powinno się przygotować każdorazowo nowy układ materiał hydrożelowy- roztwór kwasu cytrynowego i materiał hydrożelowy-bufor fosforanowy. Ponadto Autorka twierdzi, że sok z aloesu lepiej uwalnia się w środowisku kwaśnym (co jest prawdą), ale przypisuje

to protonowaniu grup NH_2 chitozanu przez jony H^+ pochodzące od roztworu kwasu cytrynowego (s.139). Wcześniej jednak (s.91) Doktoranta wskazuje, że w otrzymanych materiałach hydrożelowych nie ma grup NH_2 pochodzących od chitozanu, bo biorą one udział w tworzeniu sieci polimerowej podczas fotosieciowania. Proszę o komentarz.

Wnioski końcowe

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska p. mgr inż. Sonii Kudłacik-Kramarczyk zawiera elementy nowości naukowej w zakresie technologii chemicznej, a szczególnie w modyfikacji polimerów naturalnych. Należą do nich ocena wpływu środka sieciującego na właściwości fizykochemiczne, mechaniczne oraz strukturę materiałów hydrożelowych, ocena wpływu modyfikacji materiałów hydrożelowych sokiem z aloesu oraz roztworem albuminy inkorporowanym lekiem przeciwnowotworowym na właściwości opatrunków hydrożelowych, w tym właściwości biologiczne oraz fizykochemiczne.

Doktoranta udowodniła, że potrafi zaplanować, zrealizować i opracować wyniki badań naukowych. Ponadto warte podkreślenia jest duża liczba nagród za opracowania wynalazków będących rezultatem m.in. recenzowanej pracy doktorskiej, zdobytych przez zespół naukowy, którego członkiem jest Doktoranta. Uwagi i komentarze krytyczne nie zmieniają ogólnie pozytywnej oceny rozprawy.

Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzam, że oceniania rozprawa doktorska Pani mgr inż. Sonii Kudłacik-Kramarczyk spełnia ustawowe wymagania do nadania stopnia doktora, a zatem składam wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie pragnę podkreślić, że zarówno obszerny zakres pracy, jak i efekty w postaci 6 współautorskich publikacji w czasopismach indeksowanych oraz imponująca liczba nagród, zasługują na duże uznanie i w związku z tym wnoszę o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.

Agnieszka Kowalczyk