

Łódź, dn. 13.06.2022 r.

Prof. dr hab. inż. Grażyna Budryn
Instytut Technologii i Analizy Żywności
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

Recenzja pracy doktorskiej mgr Marty Biernackiej
wykonanej w Zakładzie Chemii Biofizycznej w Katedrze Chemii Fizycznej
na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego,
której Promotorem jest prof. dr hab. Bartłomiej Pałecz,
a Promotorem pomocniczym dr Artur Stępniaś,
pt: „Badania powstawania kompleksów inkluzyjnych cyklodekstryny
z wybranymi związkami biologicznie aktywnymi”

Recenzja wykonana na podstawie Uchwały Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni
naukowych w dyscyplinie nauki chemiczne z dn. 27 kwietnia 2022 r.

Wartość merytoryczna rozprawy

Przegląd literatury dokonany w sposób dojrzały i umiejętny przez Panią mgr Biernacką wprowadza w podjętą tematykę badawczą. Najważniejsze wnioski wynikające z krytycznej analizy literatury przedmiotu opracowanej przez Doktorantkę wskazują, że słaba rozpuszczalność w wodzie i niewystarczająca szybkość rozpuszczania to dwa kluczowe czynniki, które ograniczają proces opracowywania leków i ich zastosowania terapeutyczne. W tym kontekście, cyklodekstryny posiadające wnękę hydrofobową oferują odpowiednie środowisko wewnętrzne do interakcji, dzięki którym tworzą kompleksy inkluzyjne z szeroką gamą bioaktywnych związków hydrofobowych, zmieniając ich właściwości fizykochemiczne i biologiczne. Zmiany te mogą zwiększyć potencjał terapeutyczny leków poprzez wzrost rozpuszczalności i zmniejszenie ich degradacji przed dostarczeniem do tkanek. Wykorzystanie nośników farmaceutyków jest mniej czasochłonne i bardziej opłacalne niż opracowywanie nowych leków.

Pierwsze doniesienia o cyklodekstrinach pojawiły się w latach 60-tych ubiegłego wieku. Od lat 80-tych możemy mówić o akceleracji badań z wykorzystaniem cyklodekstryn, która trwa do dziś, ze względu na wysoką użyteczność otrzymywanych kompleksów w przemyśle farmaceutycznym i w produkcji żywności. W ostatnich latach rocznie pojawia się ponad 2000 publikacji dotyczących tego zagadnienia i ponad 4000 różnych rekordów, włączając na przykład patenty. Nie pozostawia to wątpliwości, że badanie zdolności kompleksowania różnych związków bioaktywnych z cyklodekstrynami jest zagadnieniem bardzo aktualnym i uzasadnionym. Na podstawie przeglądu literatury mgr Biernacka sformułowała cel pracy doktorskiej, którym była „próba charakterystyki kompleksów inkluzyjnych wybranych cyklodekstryn ze związkami biologicznie aktywnymi”, w którym to celu wątpliwości budzi użycie określenia „próba”, wszak zaplanowane i zrealizowane działania umożliwiły dokonanie charakterystyki, a nie było tylko „przymiarką” do charakteryzowania, a ponadto w celu brakuje zawężenia spektrum badanych ligandów, Autorka badała tylko sześć związków. Doktorantka nie przedstawiła hipotez badawczych związanych z wyznaczonym celem badań.

Praca obejmuje od strony metodycznej utworzenie kompleksów inkluzyjnych czterech pochodnych cyklodekstryny, różniących się wielkością wnęki lub rozpuszczalnością w wodzie wynikającą z derywatacji, z dwoma lekami dedykowanymi terapii chorób układu krążenia oraz z czterem flawanonomi o pochodzeniu naturalnym lub modyfikowanymi chemicznie, o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Zdolność cyklodekstryny do tworzenia kompleksu inkluzyjnego jest

funkcją czynników sterycznych i termodynamicznych. Siłą napędową kompleksacji są oddziaływania, które kształtują się w różny sposób w zależności od właściwości cyklodekstryny i liganda. Większość prac dotyczących kompleksowania leków z cyklodekstryną i jej pochodnymi dotyczy badań zmiany właściwości ligandów na skutek inkludowania i obejmuje zwiększenie rozpuszczalności i stabilności ligandów podczas przechowywania i trawienia, wzrost biodostępności, zmniejszenie toksyczności oraz modyfikacje cech fizykochemicznych. Autorka w pracy doktorskiej skupiła się na potwierdzeniu tworzenia wspomnianych kompleksów w roztworach i w formie stałej, na analizie parametrów termodynamicznych kompleksowania, określeniu stechiometrii i trwałości kompleksów, zwiększeniu rozpuszczalności związków bioaktywnych, które prowadziła metodami izotermicznej kalorymetrii miareczkowej i spektroskopii UV-vis, ponadto scharakteryzowała otrzymane kompleksy pod względem stabilności termicznej metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej oraz określiła specyfikę dokowania cząsteczki gościa we wnęce gospodarza metodą spektroskopii w podczerwieni.

Wartość naukowa rozprawy

W rozdziale dotyczącym Omówienia wyników Doktorantka przytoczyła siedem publikacji. Dość oszczędne potraktowanie dorobku innych autorów spowodowało, że Pani mgr Biernacka nie mogła w pełni wyeksponować nowatorstwa swoich badań, wskazać ich wpływu na rozwój dyscypliny naukowej. Niemniej Autorka potwierdziła tworzenie kompleksów inkluzyjnych badanych ligandów z cyklodekstrynami oraz wzrost rozpuszczalności tych ligandów na skutek inkludowania do wnętrza cyklodekstryn. Badanie kalorymetryczne wykazało samorzutny charakter tworzenia się kompleksów. Otrzymane kompleksy charakteryzowały się wysoką trwałością. Analiza stałej trwałości utworzonych kompleksów umożliwiła Pani mgr Biernackiej scharakteryzowanie wpływu różnych podstawników, na przykładzie pochodnych flawanonu, na mechanizm tworzenia i stabilizację kompleksu. Spośród badanych cyklodekstryn, na podstawie wyników swoich badań, Doktorantka wytypowała beta-cyklodekstrynę i jej pochodne, w szczególności hydroksypropylową, jako najodpowiedniejszą do otrzymywania kompleksów inkluzyjnych analizowanych związków, ze względu na łącznie rozpatrywany wzrost rozpuszczalności ligandu i trwałość powstających kompleksów. Jest to indywidualny istotny wkład Doktorantki w rozwój nauk chemicznych.

Uwagi krytyczne

Niektóre fragmenty pracy doktorskiej wymagają wyjaśnień bądź uszczegółowienia. Pierwszy z nich dotyczy badania wzrostu rozpuszczalności związków bioaktywnych na skutek kompleksowania z cyklodekstrynami, które było analizowane metodą pomiaru absorbancji fali o długości wyznaczonej jako absorbowanej w maksymalnym stopniu przez sam rozpuszczony ligand. Otóż spektrometria UV-vis jest przydatnym testem potwierdzającym występowanie kompleksowania powodującego wzrost stężenia liganda w roztworze. Należy przy tym zauważyć, że precyzja technik spektrofotometrycznych pozwala na odnotowanie niewielkich zazwyczaj zmian występujących w absorbancji, towarzyszących inkluzji liganda do cyklodekstryny. W widmach UV-vis pojawiają się przesunięcia pików absorbancji rzędu kilku nm i zmiany współczynników ekstynkcji wynoszące zazwyczaj poniżej dziesięciu procent. Zmiany te mogą wynikać między innymi z przemian sterycznych ligandów wywołanych mikrośrodowiskiem we wnęce i ze specyficznych interakcji gość-gospodarz, które mogą i najczęściej powodują zmiany spektralne i zmianę widma UV-vis liganda po inkluzji. Proszę zatem o wyjaśnienie, czy Autorka analizowała widmo nie tylko samych ligandów, ale także kompleksów cyklodekstryny z poszczególnymi ligandami i czy badała ewentualne przesunięcie maksimum absorbancji i weryfikowała niezmiennosc współczynnika ekstynkcji po inkluzji.

Druga uwaga dotyczy zakwalifikowania przez Autorkę cyklodekstryn do związków makromolekularnych, choć zwyczajowo makromolekułami określa się związki o liczbie atomów

powyżej 1000, podczas gdy badane kompleksy były zbudowane z około 300 atomów. O makromolekułach można mówić raczej w odniesieniu do tworzących się opcjonalnie agregatów kompleksów inkluzyjnych, które mogą być formami słabiej rozpuszczalnymi w wodzie. Innymi przykładami makromolekuł są anionowe polimery β -cyklodekstryny, czy kopolimer beta-cyklodekstryny-epichlorohydryny.

Uwaga odnosząca się do stosowania właściwych jednostek dotyczy tego, że przy opisywaniu prędkości wirowania stosuje się zwyczajowo jako jednostkę krotność przyspieszenia ziemskiego, ponieważ odległość próbki od rdzenia wirówki może być różna, co determinuje prędkość kątową. Prędkość w obrotach na minutę podaje się raczej w odniesieniu do ruchu mieszadła.

Kolejna uwaga dotyczy precyzji uzyskanych wyników. Dla przykładu ezetimib tworzył wg Autorki kompleks w stosunku molowym 1:1 (str. 47), a jego rozpuszczalność wzrosła o 21,2 mM, podczas gdy stężenie beta-cyklodekstryny w roztworze wynosiło maksymalnie 15 mM. Skąd zatem wzrost stężenia formy skompleksowanej większy niż stężenie gospodarza? Podobnie, stosując podczas kompleksowania stężenie innych pochodnych cyklodekstryny wynoszące 90 mM Doktorantka otrzymała wzrost rozpuszczalności tego samego związku nawet o ponad 200 mM przy jednoczesnym opisanym stechiometrii powstających kompleksów jako 1:1. Podobną uwagę można odnieść do wyznaczenia wzrostu rozpuszczalności 4'-metoksyflawanonu w obecności pochodnej hydroksypropylowej beta-cyklodekstryny. Może część związku bioaktywnego nie tworzyła kompleksu, może przyłączała się do cyklodekstryny w inny sposób niż przez inkluzję, może tworzyły się także kompleksy o innej stechiometrii? Bardzo proszę o uzasadnienie otrzymanych wyników.

Na liczbę 98 zacytowanych pozycji literaturowych 37 z nich zostało opublikowanych w ostatnim dziesięcioleciu. Biorąc pod uwagę imponującą liczbę doniesień naukowych ukazujących się każdego roku, dotyczących kompleksowania leków z cyklodekstrynami, można byłoby nadać dyskusji wyników większą aktualność właśnie poprzez liczniejsze cytowanie prac z ostatniej dekady. Przykłady poniżej:

- Yoshioka C, Ito Y, Nagai N. An oral formulation of cilostazol nanoparticles enhances intestinal drug absorption in rats. *Exp Ther Med.* 2018; 15:454-460.
- Srivalli K.M., Mishra B. Improved aqueous solubility and antihypercholesterolemic activity of ezetimibe on formulating with hydroxypropyl- β -cyclodextrin and hydrophilic auxiliary substances. *AAPS PharmSciTech.* 2016;17:272-283.

W części dotyczącej Metod badawczych i aparatury brak jest odniesień do literatury. Czy zastosowana metodyka jest autorskim opracowaniem Doktorantki?

W podsumowaniu Pani mgr Biernacka odwołała się do bardzo ogólnego wniosku z wyników badań metodą MALDI-TOF/MS i wstępnych badań biologicznych, które to wyniki nie zostały w żaden sposób opisane w pracy, zatem wniosek ten nie jest w sposób przekonujący uzasadniony.

Poprawność redakcyjna rozprawy

Cel pracy zamieszczony został we Wstępie, jest niewystarczająco wyeksponowany i mało precyzyjny.

W treści pracy pojawiło się sformułowanie „zakres promieniowania elektromagnetycznego dla światła” zamiast po prostu „zakres promieniowania elektromagnetycznego światła” (str. 30 i inne podobne).

Bardziej czytelne wydaje się zastosowanie wartości 10 min niż 600 s (str. 43).

Rozdział Podsumowanie zawiera tabele i wykresy, które stanowią powielenie wcześniej zaprezentowanych danych.

Bibliografia w opinii recenzenta powinna być zamieszczona przed Załącznikami, nie jest ponadto w ogóle wymieniona w spisie treści.

Na str. 20 wystąpił pleonazm „profilaktyka zapobiegania” podczas gdy profilaktyka to nic innego jak zapobieganie.

Doktorantka nie stosowała kursywy do przedrostka *para-* opisującego położenie podstawnika w cząsteczce flawanonów, co wprowadza zamieszanie z rzeczownikiem para, rozumianym jako dwie w określeniu „para flawanonów”, wszystko na str. 22.

Autorka wielokrotnie używała kropek jako separatora w liczbach tam, gdzie powinny być przecinki.

Ocena końcowa

Stwierdzam, że Doktorantka wykazała się umiejętnościami oryginalnego rozwiązywania problemu naukowego i zrealizowała cel postawiony w pracy. Recenzowana rozprawa doktorska mgr Marty Biernackiej spełnia warunki określone Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, i wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki chemiczne o dopuszczenie Pani mgr Marty Biernackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Grażyna Białoryn