

Gliwice, 23.01.2025 r.

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr inż. Sary Kulik pt.:

„Warstwy polimerowe oparte na piroliu jako nowoczesne systemy dozowania substancji leczniczych o aktywności neurologicznej”

Jednym z kluczowych wyzwań współczesnej medycyny jest opracowanie nośników leków, które umożliwią precyzyjne dostarczenie terapeutycznych dawek substancji aktywnej bezpośrednio do miejsca wymagającego leczenia. Tradycyjne metody podawania leków oparte są na leczeniu systemowym, w którym jedynie część leku trafia do miejsca przeznaczenia. Ma to szczególne znaczenie w przypadku chorób neurodegeneracyjnych obejmujących centralny układ nerwowy, w którym transport leków utrudnia istnienie bariery krew-mózg.

W swojej pracy doktorskiej, Pani mgr inż. Sara Kulik zajęła się projektowaniem nowoczesnych systemów dozowania leków opartych na polipiroliu i sprawdziła ich działanie na trzech układach związków biologicznie aktywnych, tj. heparyna + chlorowoderek chloropromazyny, heparyna + chlorowoderek amantadyny, heparyna + chlorowoderek memantyny. Pani mgr inż. Sara Kulik wykonywała badania w Instytucie Inżynierii Materiałowej, na Wydziale Nauk Ścisłych i Technicznych Uniwersytetu Śląskiego, pod kierunkiem prof. dr hab. Danuty Stróż oraz dr inż. Sylwii Golby. Przedmiot badań prowadzonych przez Panią Kulik jest nowatorski i spełnia warunek oryginalności naukowej stawiany pracom doktorskim.

Praca doktorska Pani mgr inż. Sary Kulik ma układ klasyczny. Praca liczy, wraz ze spisem cytowanej literatury, 168 stron, a tekst został podzielony na 3 główne części (Część teoretyczną, Część badawczą, Wyniki badań i dyskusję), które wieńczy rozdział Podsumowanie i wnioski. Bibliografia liczy 249 pozycji i w większości składają się na nią „klasyczne” pozycje literaturowe – stosunkowo niewiele jest źródeł opublikowanych w ciągu ostatnich 5 lat. Odbiór tej części pracy utrudnia niekonsekwencja w prezentowaniu bibliografii, tj. brak jednego rodzaju formatowania szczegółów bibliograficznych cytowanych źródeł.

Praca napisana jest w sposób poprawny, chociaż znajduje się w niej szereg błędów, które niepotrzebnie odwracają uwagę od poruszanych w niej kwestii merytorycznych, jak np. błędy stylistyczne („Wprowadzone do uszkodzonych przez choroby nerwów neurodegeneracyjne rusztowania (...)” – str. 6-7; „Przewodzące interfejsy neuronowe dostosowane do interakcji komórkowych” – str. 10; umiarkowane warunki ciężkiej choroby Alzheimera – str. 21), nomenklaturowe (Fe_3O_4 podpisany jako tlenek żelaza (II) – str. 8), niepotrzebne powtórzenia („Przewodnictwo i właściwości magnetyczne nanorurek PANI zawierających nanocząstki Fe_3O_4 wykazały wysoką przewodność i zachowanie superparamagnetyczne”, str. 8), błędne w odmianie wyrazów („w PEDOT-cie” – str. 10), a także niezręczności w tłumaczeniu angielskich terminów („hamowanie awarii neuroprzebieżnika acetylocholiny” – str. 13; „mechanizm włączania i uwalniania leku z polimeru przewodzącego” – str. 15; „Nanowłókna obciążone deksametazonem” – str. 16; awaria powłoki – str. 38). Dodatkowo niejednokrotnie można zauważyć brak rozwinięcia skrótów w miejscu ich wprowadzenia (NMDA, po raz pierwszy wspomniany na str. 6, z pełną nazwą wyjaśnioną na str. 21). Niektóre rysunki i schematy wydają się niepotrzebne (Rys.1 – zbyt ogólny, Rys.8, Rys. 24-27, Rys. 31a).

Część teoretyczna słusznie podzielona została na podrozdziały opisujące kolejno polimery przewodzące (ze szczególnym uwzględnieniem ich mechanizmu przewodzenia), choroby neurodegeneracyjne i systemy dozowania substancji leczniczych, następnie materiały wykorzystywane w pracy doktorskiej (polipirol, heparynę, dodecylosiarczan sodu (SDS) oraz trzy wybrane związki biologicznie aktywne - chlorowodorek chloropromazyny (CPZ), chlorowodorek amantadyny (AMA), chlorowodorek memantyny (MEM)), a potem zastosowane metody badawcze. Również tutaj nie obyło się bez niekonsekwencji, np. przy opisie AFM tuż po zdaniu „W pracy został wykorzystany tryb kontaktowy” pojawia się tabela opisująca szczegóły trybu bezkontaktowego, którego wyniki prezentowane są następnie na rys. 16. Pewnym zaskoczeniem dla czytelnika jest pojawienie się wśród metod badawczych testów mikrobiologicznych, ponieważ we wcześniejszych częściach pracy doktorskiej nie jest zasygnalizowane, jaka jest rola właściwości przeciwbakteryjnych w projektowaniu układów dostarczania leków skutecznych w walce z chorobami neurodegeneracyjnymi. Można zastanawiać się, dlaczego właściwości biologiczne otrzymanych materiałów zostały zweryfikowane względem mikroorganizmów, a nie np. komórek nerwowych – tak jak wspomniane jest przy okazji opisywania wyników poprzednich prac (np. [19]). **W związku z tym bardzo proszę o komentarz dotyczący podstaw decyzji przeprowadzenie pomiarów aktywności mikrobiologicznej otrzymanych materiałów.**

Cel pracy został jasno określony, a hipoteza badawcza wyraźnie przedstawia podjęty problem badawczy. Przedstawiona praca doktorska zawiera odpowiedź na dwa spośród trzech głównych pytań badawczych, pozostawiając zagadnienie dotyczącym aplikowalności otrzymanych materiałów przedmiotem dalszych badań.

Część eksperymentalną pracy doktorskiej Pani mgr inż. Sary Kulik rozpoczyna opis metodologii badań. Krok po kroku opisane są procedury przygotowania próbek i przeprowadzania poszczególnych eksperymentów. Brakuje jednak opisu badań XRD. Mam kilka pytań dotyczących opisanej metodologii:

- Jakiego rodzaju destylacji użyto do oczyszczenia pirolu?



- Jak wyglądał schemat układu pomiarowego (rozmieszczenie elektrod w kuwecie) podczas badania procesów uwalniania substancji leczniczych z warstw polimerowych? Dlaczego 48-godzinną stymulację przeprowadzono w 0.1 M roztworze SDS, a nie 0.9 % NaCl?

- Przygotowanie próbek do badań mikrobiologicznych wymagało ich sterylizacji – czy sprawdzono, jak wyjąłowanie materiałów polimerowych alkoholem etylowym w płucce ultradźwiękowej wpłynęło na ich strukturę i zawartość substancji leczniczych?

W części dotyczącej przedstawienia wyników badań i ich dyskusji, Pani mgr inż. Sary Kulik metodycznie opisuje przeprowadzone eksperymenty. Uwagę zwraca skrupulatność w planowaniu poszczególnych etapów badań. Zaletą jest fakt, że Pani Kulik dokonała dokładnej charakterystyki fizykochemicznej badanych substancji, wliczając w to m.in. analizę materiałów elektrodowych (mikrostruktura powierzchni przed i po procesie szlifowania) oraz roztworu elektrolitu (gęstość, przewodność, lepkość), co nie zawsze ma miejsce w pracach naukowych. Będę wdzięczna za komentarz dotyczący przewodności roztworu elektrolitu (SDS), która wynosi 1.830 ± 0.842 mS/cm (0.05 M SDS) oraz 3.850 ± 0.0307 mS/cm (0.1 M SDS), a jest znacznie niższa od przewodności typowo stosowanych roztworów elektrolitów (np. 12.9 mS/cm dla 0.1 M KCl). **Jakie są konsekwencje stosowania elektrolitu o tak niskiej przewodności?** Pani Kulik sama zauważa, że „Konieczne są duże stężenia elektrolitów pomocniczych, aby zwiększyć przewodność roztworu” – str. 55, a także „Wysokie stężenie elektrolitu w stosunku do stężenia analitu gwarantuje, że statystycznie bardziej prawdopodobne jest, że elektrolit będzie migrował na powierzchnię elektrody w celu zrównoważenia ładunku” – str. 56. **Jak wybór niskiego stężenia elektrolitu podstawowego (0.05-0.1 M) koreluje ze stosunkowo wysokim stężeniem monomeru (0.2 M)?**

W kolejnej części pracy, Pani Kulik opisuje syntezę elektrochemiczną i dokonuje charakterystyki fizykochemicznej polipirolu otrzymanego na różnych podłożach, w obecności różnych elektrolitów oraz substancji biologicznie aktywnych. Dużym plusem pracy doktorskiej jest systematyczne podejście do zagadnienia modyfikacji powierzchni elektrod, zaczynając od analizy układów klasycznych (pirol, NaCl, woda) i stopniowo zmieniając poszczególne warunki (np. zamiana elektrolitu podstawowego z NaCl na SDS, wprowadzenie heparyny, wprowadzenie leku). Analiza filmów polimerowych i optymalizacja procesu polimeryzacji na każdym z etapów z osobna umożliwi lepsze poznanie wpływu poszczególnych parametrów na właściwości otrzymanych materiałów.

Polimeryzacja pirolu w warunkach wodnych w obecności 0.9% NaCl stanowi tzw. „punkt wyjścia” dla dalszych prac, dlatego też sam proces elektropolimeryzacji został w tej części dokładnie opisany. Niektóre sformułowania wymagają zastanowienia, np. „Podczas skanowania w przód, potencjał jest przesuwany ujemnie z potencjału początkowego E_1 do potencjału końcowego E_2 ” – str. 55; „Badania te potwierdziły, że możliwe jest zsyntezowanie zaproponowanej matrycy polimerowej w 0.9% roztworze soli fizjologicznej, jednak nie posiada ona dużej zdolności gromadzenia ładunku” (str. 56) – sposób oceny ilości zgromadzonego ładunku nie został tu jednak wyjaśniony. Otrzymane warstwy zostały dokładnie scharakteryzowane pod kątem ich mikrostruktury z wykorzystaniem takich technik jak SEM i AFM. Cennych informacji dostarczyła również analiza XRD oraz testy adhezyjne. Następnym etapem badań było zastąpienie środowiska soli fizjologicznej roztworem SDS, a następnie optymalizacja procesu polimeryzacji pirolu i charakterystyka otrzymanych warstw polimerowych. W tej części wprowadzone

zostają parametry ilościowe oceny jakości filmu polimerowego, m.in. wskaźnik stabilności warstwy oraz jej grubość. **Proszę o komentarz, co było podstawą doboru zakresu potencjałów krzywych woltamperometrycznych służących do wyznaczenia wskaźnika stabilności warstwy.** Bardzo proszę o odniesienie się do zdania ze str. 64 („Pierwszy czynnik związany jest z mechanizmem osadzania materiału na powierzchni elektrody, kiedy następuje adsorpcja niskorozpuszczalnych łańcuchów prowadząc do powstania cienkiej, porowatej warstwy [159], [160], co prowadzi do zamknięcia w jej strukturze rozpuszczalnych oligomerów lub cząsteczek monomeru [161], które mogą spolimeryzować w kolejnych cyklach CV”). **Proszę o opisanie, jakie konsekwencje miałyby porównanie stabilności warstw polimerowych w oparciu o krzywe woltamperometryczne zebrane w różnych zakresach potencjałów (Rysunek 43 b, d, f).** Kolejną kwestią jest słuszność wykorzystania wzoru (15) do oszacowania grubości warstw polimerowych. **Proszę o komentarz, jakie konsekwencje ma wykorzystanie w tym wzorze stałej wartości gęstości filmu polimerowego ($1.48 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$).** Bardzo proszę o odniesienie się do zdania ze str. 64 „W badaniach Halik i in. większy poziom domieszkowania (w przypadku standardowo grubych filmów) podczas syntezy elektrochemicznej powodował bardziej zwarte upakowanie łańcuchów PPy, a co za tym idzie, zwiększała się gęstość folii i zmniejszały się pory, co dawało wysokie wartości stabilności elektrochemicznej. Na podstawie tych stwierdzeń można uznać, że na filmach w obecnych badaniach nastąpiły zmiany porowatości”. Zastanawiające jest, że chropowatość filmów PPy otrzymanych w roztworze SDS wynosiła 80-96 μm , mimo że ich grubość oszacowano na zaledwie 2-14 μm .

Następne części pracy badawczej opisują wprowadzenie do układu pirol/SDS kolejnych substancji biologicznie aktywnych. Pierwszą z nich jest heparyna, której wprowadzenie do matrycy polimerowej nastąpiło podczas procesu elektropolimeryzacji. **Na niektórych krzywych woltamperometrycznych przedstawiających proces polimeryzacji pirolu pojawiają się tzw. pętle nukleacji (np. Rys. 51a), a na niektórych nie (np. Rys. 51b). Jak można to wytłumaczyć?** Następnie roztwór elektrolitu wzbogacono o substancję biologicznie aktywną, którą były kolejno CPZ, AMA i MEM. Tak jak poprzednio, otrzymane filmy zostały scharakteryzowane z wykorzystaniem woltamperometrii cyklicznej, mikroskopii AFM oraz mikroskopii SEM, a filmu zawierające leki dodatkowo z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni w celu potwierdzenia obecności leku, a także testów adhezji. Bardzo interesujące jest porównanie morfologii powłok przed i po procesie uwalniania.

Kluczowym elementem oceny przydatności warstw polipirolu otrzymanych w obecności SDS, heparyny i wybranych leków jest określenie ilości i kinetyki uwalniania leków. W przedstawionej pracy, Pani Kulik wybrała do tego celu spektrofotometrię UV-Vis. **W części eksperymentalnej nie sprecyzowano, w jaki sposób wyznaczono współczynniki absorpcji HEP/CPZ/AMA/MEM – czy były to wartości literaturowe czy wyznaczone eksperymentalnie? Jeśli wyznaczono je w ramach pracy, to w jakich warunkach? Jak wyglądały krzywe kalibracyjne?** Do określenia stężenia związków biologicznie aktywnych wykorzystano absorbancje dla charakterystycznych długości fali, np. 253 nm dla CPZ i 213 nm dla HEP. W takich przypadkach często wykorzystuje się metody chromatograficzne, np. HPLC, aby wykluczyć możliwość nakładania się sygnałów pochodzących od różnych substancji. W przypadku analizy procesu uwalniania warto byłoby skomentować następujące aspekty:

- **Czy zarejestrowano widma UV-Vis dla roztworów pirolu i SDS, aby wykluczyć możliwość nakładania się ich absorbancji na sygnały pochodzące od leków?**



- Jeżeli na widmach UV-Vis kolorem niebieskim oznaczono widmo początkowe, a kolorem czerwonym kolorem oznaczono widmo końcowe, to co jest przyczyną zmniejszenia się absorbancji dla HEP (213 nm) na Rys. 64c i Rys. 78c?
- Co jest przyczyną istotnych różnic w ilości uwolnionego leku (CPZ) oszacowanych za pomocą spektrofotometrii UV-Vis (15-73 mg/cm²) – str. 97 i elektrogravimetrii EQCM (15.3 µg) – str. 99?
- Dlaczego podczas badania uwalniania CPZ za pomocą EQCM zaobserwowano zmniejszanie częstotliwości i zwiększania masy elektrody?
- Układ AMA:HEP:Py zmieszany był w stosunku molowym 1:0.002:1, a stężenie monomeru wynosiło 0.2 M. Wynika z tego, że w procesie polimeryzacji stężenie AMA wynosiło również 0.2 M. Dlaczego więc stężenie AMA po procesie uwalniania wynosiło nawet 3.15 M (Tabela 26, film f₁₉, C dla u. 0.7 V)? Jednocześnie w Tabeli 27 efektywność enkapsulacji filmu f₁₉ w stosunku do AMA została określona jako 31.50 ± 0.28 %.

Następny rozdział opisuje długoterminowe uwalnianie substancji leczniczych z wybranych matryc polimerowych, dzięki czemu możliwe było określenie kinetyki uwalniania leków i stwierdzenie możliwości wykorzystania opracowanych materiałów w farmakoterapii. Pani Kulik porównała trzy modele matematyczne opisujące kinetykę kontrolowanego uwalniania leków, a następnie wykonała symulację dopasowania do nich danych eksperymentalnych. W ten sposób mogła zbadać, czy zaproponowany przez nią układ zapewni uwalnianie leku w ilościach terapeutycznych. W pracy napisano, że proponowane systemy mogą zapewnić dawkowanie 70 mg na dobę, co zostało obliczone na podstawie zawartości leku w 1 cm³ próbki (str. 138). **Jaką wymiary musiałby mieć film polimerowy, aby jego objętość wynosiła 1 cm³? Czy synteza i implantacja układu o takiej geometrii byłaby realna?**

Część badawczą wieńczy rozdział opisujący badania właściwości przeciwbakteryjnych otrzymanych materiałów. **Niestety ani w części teoretycznej ani w dyskusji otrzymanych wyników nie jest opisane, który element układu, tj. polipirol, SDS, heparyna, AMA, CPZ czy MEM mógłby być odpowiedzialny za właściwości przeciwbakteryjne i na czym polega proponowany mechanizm tej aktywności.**

W podsumowaniu recenzji chcę podkreślić skrupulatność w planowaniu i realizacji badań prowadzonych przez Panią Kulik, dzięki czemu jej praca doktorska pozwala na zrozumienie zmian w strukturze wybranego polimeru przewodzącego, polipirolu, w kolejnych etapach jego modyfikacji.

Stwierdzam, że rozprawa Pani mgr inż. Sary Kulik pt. „Warstwy polimerowe oparte na piroliu jako nowoczesne systemy dozowania substancji leczniczych o aktywności neurologicznej” spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określonym w ustawie o tytule i stopniach naukowych i zwracam się do Rady Dyscypliny Naukowej z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr inż. Sary Kulik do dalszych etapów przewodu doktorskiego, tj. publicznej dyskusji nad rozprawą.