

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Daniela Kramarczyka

„Mechanizmy odpowiadające za poprawę fizycznej stabilności amorficznych farmaceutyków po zastosowaniu krzemionkowych materiałów nanoporowatych”

Praca doktorska pana mgr inż. Daniela Kramarczyka powstała na Wydziale Nauk Ścisłych i Technicznych Uniwersytetu Śląskiego pod kierunkiem pani dr hab. inż. Justyny Knapik-Kowalcuk, profesora uczelni. Jest oparta o cykl artykułów A1, A2 i A3, który dotyczy badań nad poprawą stabilności termodynamicznej wybranych amorficznych substancji leczniczych dzięki dodaniu nanoporowatego materiału krzemionkowego. Poznanie własności termicznych i dynamicznych takich układów doprowadziło do zrozumienia mechanizmów hamowania procesu krystalizacji. Lepsza rozpuszczalność amorficznej formy leku w wodzie zapewnia poprawę biodostępności ważną dla pacjentów zainteresowanych otrzymywaniem skutecznych, lecz jak najmniejszych dawek. Jednak brak stabilności formy amorficznej wyklucza możliwość proponowania czystej substancji jako leku. Problemem jest transformacja fazy amorficznej podczas ogrzewania do stabilniejszej fazy krystalicznej - w tym względzie badania doktoranta nad sposobami zapobieżenia temu procesowi są bardzo istotne. Wyniki badań pana mgr inż. Daniela Kramarczyka zostały opublikowane w latach 2020-2024 w bardzo dobrych czasopiśmie naukowych: *Pharmaceutics*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* oraz *Molecular Pharmaceutics*, dla których współczynniki oddziaływania IF wynoszą odpowiednio 4.9, 4.3 oraz 4.5. Publikacje są 6- cio autorskie - pan mgr inż. Daniel Kramarczyk jest 2-gim autorem w pracy A1 i pierwszym w dwóch pozostałych. Oświadczenia 11-tu współautorów przekonują o zasadniczej roli doktoranta w powstaniu publikacji; z jego oświadczeń zamieszczonych przed kopią każdej publikacji wiadomo, że przygotował pierwotne wersje manuskryptów prac A2 i A3, miał aktywny udział w pracy nad manuskrytem publikacji A1, przeprowadził analizę wszystkich otrzymanych wyników oraz wykonał pomiary kalorymetryczne i dielektryczne. Rezultaty tych badań zostały przedstawione na trzech konferencjach międzynarodowych poświęconych molekularnym materiałom o własnościach leczniczych. O aktywności naukowej pana mgr inż. Daniela Kramarczyka świadczy również współautorstwo publikacji B1-B10 o tematyce wykraczającej poza pracę doktorską. Badania, które prowadził miały finansowanie z Narodowego Centrum Nauki w ramach projektów: SYMFONIA 3 pt.: "Wpływ procesów fizycznych oraz substancji pomocniczych na charakterystykę substancji leczniczych trudno rozpuszczalnych w wodzie" oraz OPUS 16 pt.: "Badanie właściwości polimerowych matryc z substancjami leczniczymi otrzymywanych techniką druku 3D", a ponadto stanowiły wkład do Inicjatywy Doskonałości Uniwersytetu Śląskiego.

Praca doktorska pana mgr inż. Daniela Kramarczyka składa się z pięciu rozdziałów. Rozdział 1 stanowi Wstęp, który omawia problemy związane z biodostępnością leków w formie krystalicznej i z poprawą ich rozpuszczalności w wodzie, a także czynniki zwiększające ich stabilność po dodaniu nanoporowatego materiału krzemionkowego. Przedstawione są wzory strukturalne trzech przebadanych leków, tj., symwastatyny, normalizującej stężenie lipidów we krwi pacjenta, aripiprazolu, stosowanego w psychiatrii oraz celekoksylu o działaniu przeciwbólowym i przeciwzapalnym. Wstęp zakończony jest listą prac A1-A3 oraz prac B1-B10, i listą międzynarodowych konferencji, na których uzyskane w pracy doktorskiej wyniki były przedstawiane. Rozdział 2 to kompetentne i ciekawe omówienie badań przedstawionych w artykułach A1-A3, których teksty, wraz z oświadczeniami poszczególnych autorów o wkładzie w ich powstanie, stanowią Rozdział 3-

ci. Cztery paragrafy rozdziału drugiego zawierają charakterystykę przejść fazowych oraz procesów relaksacyjnych w symwastatinie, celekoksybie oraz aripiprazolu powyżej temperatury przejścia szklistego, a także przykłady efektów dodania do farmaceutyków krzemionkowego stabilizatora Syloidu o mikrometrycznych cząstkach. Rozdział stanowi dobre i treściwe (9 stron, 3 podwójne rysunki) wprowadzenie do problematyki pracy, pokazujące jej najważniejsze wyniki. Istotne jest porównanie termogramów DSC badanych substancji uzyskanych przy ogrzewaniu formy krystalicznej i amorficznej, które pokazują różny polimorfizm leków i odmienną skłonność do rekrytalizacji. Podsumowanie rezultatów, otrzymanych w poszczególnych publikacjach przedstawione w półtorastronnicowym Rozdziale 4 wydaje się nadmiernie skrótowe, zważywszy na ciekawe wyniki uzyskane przez pana mgr inż. Daniela Kramarczyka. Rozdział 5 to Bibliografia, którą stanowi 41 pozycji literaturowych, w tym 11 ważnych publikacji z Uniwersytetu Śląskiego; pani dr hab. inż. Justyna Knapik-Kowalczyk jest współautorem 8-iu z nich (w 5 jest pierwszym autorem).

Prace A1-A3, stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej pana mgr inż. Daniela Kramarczyka, zawierają szereg ważnych wyników z dziedziny fizyki materii miękkiej. Publikacja A1 pt.: "Importance of mesoporous silica particle size in the stabilization of amorphous pharmaceuticals - the case of simvastatin" w Pharmaceutics dotyczy badań metodami różnicowej kalorymetrii skaningowej i szerokopasmowej spektroskopii dielektrycznej nad tendencją do rekrytalizacji w symwastatinie czystej oraz z niewielkim 9 % -wym dodatkiem Syloidu o mikrometrycznych rozmiarach cząstek. Podczas obserwacji nieizotermicznych czysty lek nie ulega rekrytalizacji, ale jest ona rejestrowana w warunkach izotermicznych. Analiza kinetyki krystalizacji leku pokazała, że proces można zahamować w obecności cząstek o rozmiarze kilku μm , zaś w przypadku cząstek większych (o rozmiarze 59 μm) pełny czas procesu ulega wydłużeniu (z 5 h do 8 h w obserwacjach DSC i z 1 dnia do 3 dni w pomiarach BDS) a wymiarowość krystalizacji maleje. Stwierdzenie zależności efektu stabilizacji amorficznej symwastatyny od wielkości cząstek Syloidu jest ważnym i zaskakującym wynikiem, bo w obu porowatych materiałach wielkość i objętość porów oraz powierzchnia oddziaływania z molekułami leku są podobne. Równocześnie, dla obu rozmiarów cząstek Syloidu zaobserwowano jednakową liniową zależność skoku ciepła ΔC_p w temperaturze zeszklenia od stężenia symwastatyny, z zerową wartością ΔC_p gdy jest jej w układzie 15% - odpowiada to warstwie pojedynczych unieruchomionych molekuł leku wokół cząstek. Podobnie, w nieizotermicznym eksperymencie DSC dla obu mieszanin stwierdzono jednakowe temperatury zarówno dla topnienia fazy krystalicznej jak i dla zeszklenia fazy przechłodzonej. Z tym wiąże się jednakowy dla tych układów opis równaniem Vogela-Fulchera-Tammanna temperaturowych zmian dynamiki, dającej w obserwacjach BDS relaksację strukturalną, i podobna wartość parametru fragility $m \sim 90$ oraz parametru $\beta_{KWW} \sim 0.6$, opisującego kształt krzywej absorpcji dielektrycznej. Nie stwierdzono również wpływu obecności Syloidu na relaksacje drugorzędowe β i γ . Wnioskiem z powyższych rezultatów jest wyjaśnienie zahamowania krystalizacji w obecności Syloidu o μm cząstkach tym, że stwarzają one istotne zawady dla ruchów dyfuzyjnych molekuł leku, co utrudnia wzrost zarodków fazy krystalicznej i zapewnia stabilność leku w formie amorficznej. Trafność wyboru takiego mechanizmu potwierdzają obserwacje mikroskopowe, gdzie można stwierdzić mniejszą swobodną przestrzeń dla wzrostu kryształków symwastatyny w przypadku mniejszego rozmiaru dodanych cząstek. Zaproponowany przez pana mgr inż. Daniela Kramarczyka mechanizm pozwala również zrozumieć spowolnienie procesu krystalizacji po dodaniu Syloidu o większych cząstkach, gdyż powodują one znaczące zmniejszenie obszarów o uporządkowaniu krystalicznym w porównaniu z sytuacją w czystym leku.

"Inhibition of celecoxib crystallization by mesoporous silica - molecular dynamics studies leading to discovery of the stabilization origin" to tytuł publikacji A2, która przedstawia badania tego jak zwiększanie stężenia Syloidu o małych cząstkach wpływa na wzrost liczby sterycznych przeszkód w mieszaninie, przebieg krystalizacji i inne własności fizyczne farmaceutyka zwanego celekoksybem, z trzema atomami fluoru w molekuale. Ważne, że badania spektroskopowe wykluczyły obecność dwu odmian polimorficznych leku w mieszaninie, chociaż przy ogrzewaniu na diagramie DSC pojawiała się dodatkowa anomalia poniżej temperatury topnienia czystego farmaceutyka. W nieizotermicznych badaniach układów metodą BDS stwierdzono, że powyżej 27 % -wej koncentracji Syloidu zanika tendencja do zimnej krystalizacji i fizyczna stabilność leku jest dobra. Nowym wynikiem jest stwierdzenie, że w ustalonej temperaturze parametr β_{KWW} charakteryzujący straty dielektryczne wyraźnie maleje ze wzrostem koncentracji Syloidu. Badania izotermiczne pozwoliły ustalić, że wraz ze wzrostem koncentracji stabilizatora istotnie rośnie połówkowy czas charakteryzujący tempo procesu krystalizacji, która nie jest pełna, a w mieszaninie narasta udział fazy amorficznej leku. Co ciekawe, dla takich próbek przeprowadzono ponownie eksperyment nieizotermiczny, aby się przekonać jak zmieni się dynamika molekuł leku w obecności frakcji krystalicznej. Wówczas, oprócz zmodyfikowanej relaksacji strukturalnej pojawił się dodatkowy niskoczęstotliwościowy process Maxwella-Wagnera-Sillarsa, którego zależność temperaturowa była Arrheniusowska, a intensywność narastała ze stężeniem Syloidu. Z uzyskanych rezultatów wynika, że hamowanie procesu rekryystalizacji ze stężeniem Syloidu jest efektem nie tylko wzrostu liczby sterycznych zawał ale również oddziaływań części molekuł celekoksybu z powierzchnią cząstek, co wpływa na rozrastanie się frakcji amorficznej.

Tytuł ostatniej pracy A3 cyklu "Tuning the physical state of aripiprazole by mesoporous silica" wskazuje, że dotyczy ona wprowadzania zmian we własnościach fizycznych aripiprazolu poprzez odpowiednie dodawanie nanoporowatego materiału krzemionkowego. Ze względu na wydłużone giętke molekuly, w przeciwieństwie do omawianych wcześniej leków, objawia on bogaty polimorfizm z 9-ma odmianami polimorficznymi. Przy ogrzewaniu stanu krystalicznego zaobserwowano anomalie topnienia odmian polimorficznych IV-I, zaś powyżej przejścia szkło-ciecz rejestrowano zimną krystalizację i topnienie dwóch odmian krystalicznych: formy IV i formy III. Badania tego jak poprawić stabilność aripiprazolu są zatem szczególnie istotne. Termogramy DSC zeszlonego aripiprazolu czystego i w mieszaninie, stowarzyszone z rejestracją odpowiednich dyfraktogramów, pokazały, że wielkość zawartości Syloidu wpływała na obraz polimorfizmu fazy stałej i na nukleację różnych form polimorficznych leku. Obrazowały to nietypowe zmiany temperatury krystalizacji T_c : do 27 %-wej zawartości Syloidu w mieszaninie wartość T_c malała, gdyż następowało wspomaganie krystalizacji formy III, a następnie zaczynała rosnąć ze względu na zawały steryczne przeszkadzające molekułom w porządkowaniu się do formy IV lub X. Zanik procesu krystalizacji następował przy 65 %-wej zawartości, gdy utworzyły się warstwy pojedynczych unieruchomionych molekuł wokół powierzchni cząstek, co manifestowało się liniowym spadkiem do zera skoku ciepła w przejściu szklistym i wzrostem amorficznej frakcji leku. Czynnikiem decydującym o stabilności leku nie jest modyfikacja dynamiki molekuł aripiprazolu pod wpływem dodania Syloidu, gdyż nie ma on wpływu ani na wartość T_g ani na temperaturowe zmiany procesów relaksacji β i γ (przypisanych odpowiednio ruchom intermolekularnym i intramolekularnym) oraz procesu strukturalnego, umożliwiającego rejestrację zimnej krystalizacji powyżej T_g . Nie jest ona pełna, część objętości mieszaniny pozostaje amorficzna i tak jak dla celekoksybu wraz ze wzrostem zawartości Syloidu maleje wartość parametru β_{KWW} , co wskazuje na zwiększanie się korelacji reorientujących molekuł leku, niejednorodności mieszaniny oraz hamowanie procesu nukleacji.

Poniżej wymieniam pewne przeoczenia, nieścisłości i niezręczne sformułowania, na które natrafiłam podczas recenzowania pracy doktorskiej:

W spisie treści użyty jest skrót NMK, wyjaśniony dopiero na str. 5 pracy.

Brakuje mi podsumowania w języku angielskim najważniejszych rezultatów badań.

Nie wymieniono tytułów referatów doktoranta, a jedynie nazwy konferencji, na których wyniki pracy doktorskiej były przedstawiane.

Brakuje wyjaśnienia idei wyboru do badań substancji o tak różnej strukturze molekuł oraz informacji o ich rozmiarach i wielkości momentu dipolowego.

Sformułowanie "...wewnątrz DSC..." jest niezręczne (str. 9).

Zamiast "ilość" cząstek (str. 13), odmian... (str.12) powinno być liczba cząstek, odmian... .

Pod rys. 5 na str. 16 napisano o "zależności stężenia celekoksybu od wartości ΔC_p " a to skok wielkości ciepła w przejściu szklistym zależy od stężenia substancji (nie wyjaśniono co oznacza ΔC_p).

Na str. 29 parametr D we wzorze (7) jest pod wzorem oznaczony literą B , podobnie jak w Tabeli 4 (str.30).

Na str. 31, zamiast "Neat SVT" jest "Nast SVT".

Rysunki przedstawiające krzywe absorpcji dielektrycznej celekoksybu na str. 49 są niewyraźne.

Na str. 63, zamiast "chromatography" powinno być "calorimetry".

Na str. 64, zamiast "three" powinno być "two".

Przy $m=91$ wymieniona wartość D dla aripiprazolu nie wydaje się poprawna (str. 65), jest to najprawdopodobniej wartość DT_o .

W pracy doktorskiej pana mgr inż. Daniela Kramarczyka otrzymano wyniki ważne tak w aspekcie badawczym jak i ze względu na możliwość ich wykorzystania w farmakologii. Do badań wybrano trzy znane substancje lecznicze, o różnej strukturze molekuł, różnym polimorfizmie fazy stałej i innej tendencji do rekrytalizacji, które charakteryzuje zeszklenie powyżej temperatury pokojowej. W kolejnych, ciekawych i dobrze przygotowanych publikacjach pokazano, że zmiany w procesie krystalizacji pod wpływem dodania do leku wybranego nanoporowatego materiału krzemionkowego zależą nie tylko od rozmiaru jego cząstek (praca A1) i stężenia w mieszaninie (A2), ale także od własności fizycznych samego leku (A3). Wykazanie, że mechanizmami stabilizacji amorficznych leków przy rosnącej koncentracji stabilizatora w mieszaninie jest wzrastająca siła oddziaływań molekuł leku z powierzchnią cząstek stabilizatora oraz zwiększająca się liczba odpowiedniej wielkości zawał sterycznych, utrudniających wzrost fazy krystalicznej, to najważniejszy wynik pracy.

Uważam, że przesłana do recenzji rozprawa czyni zadość wymogom stawianym pracom doktorskim i kieruję wniosek do Rady Naukowej Instytutu Fizyki Uniwersytetu Śląskiego o dopuszczenie mgr inż. Daniela Kramarczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego

M. Massalska-Arodz

Kraków, 2 IV 2025

prof. dr hab. Maria Massalska-Arodz