



INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ
im. Henryka Niewodniczańskiego
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Kraków, 29 wrzesień 2022

Dr hab. Władysław Węglarz, profesor instytutu
Zakład Tomografii Magnetyczno-Rezonansowej
Instytut Fizyki Jądrowej PAN
W Krakowie

Recenzja pracy na stopień doktora nauk fizycznych, mgr Karola Kubata, zatytułowanej „Zachowanie śladowej wody związanej w układach farmaceutycznych i żywych organizmach anhydrobiotycznych”, wykonanej pod opieką promotorów prof. dr hab. Huberta Harańczyka i dr hab. Anny Krupy

Celem przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej było zbadanie zachowania śladowych ilości wody w układach farmaceutycznych, obejmujących trudno rozpuszczalne, hydrofobowe substancje lecznicze (tadalafil i bozentan) oraz ich stałe rozproszenia w hydrofilowych polimerach (odpowiednio Soluplus i kopowidon). Dodatkowym aspektem pracy było porównanie zachowania wody w tych układach z tym które obserwowane jest w organizmach żywych, na przykładzie zlichenizowanego grzyba *Niebla tigrina* z pustyni Atacama. Do badań tych Doktorant wykorzystał techniki kinetyki hydratacji oraz relaksometrii i spektroskopii $^1\text{H-NMR}$.

Zagadnienie którego zbadania podjął się doktorant jest ważne, jako że własności hydratacyjne produktów farmaceutycznych mają istotne znaczenie dla dostępności biologicznej zawartych w nich substancji leczniczych, stąd każde poszerzenie wiedzy dotyczącej tych własności jest niezwykle pożądane.

Przedstawiona do oceny rozprawa poprzedzona jest krótkim streszczeniem w języku polskim i angielskim, a także zestawieniem dorobku naukowego Doktoranta. Dorobek ten obejmuje listę pięciu publikacji (z których w dwu jest pierwszym autorem), dwunastu prezentacji konferencyjnych (w dwu jest pierwszym autorem) oraz dwu projektów których realizacji Doktorant uczestniczył w ramach realizacji pracy doktorskiej.

Sama rozprawa zawiera na początku spis symboli i skrótów, oraz krótkie Wprowadzenie wyjaśniające kontekst prowadzonych badań i zawierające zwięzły opis zawartości rozdziałów rozprawy. Została ona podzielona na sześć głównych części, które poświęcone są kolejno: wstępnej charakterystyce badanych układów, podstawom teoretycznym badanych zjawisk oraz metod badawczych, opisowi wykorzystanych materiałów i użytych metod, opisowi wyników oraz ich dyskusji. W ostatnim, szóstym rozdziale Doktorant sformułował dwanaście najważniejszych wniosków płynących z pracy. Na końcu zamieszczone zostały spis rysunków, spis tabel oraz bibliografia obejmująca 75 pozycji.



W części pierwszej, Wstępie, omówione zostały kolejno: podstawowe własności fizykochemiczne wody stanowiące podstawę procesów sorpcji, substancje farmaceutyczne wchodzące w skład badanych układów proszkowych (stałych rozporoszeń) oraz porost *Niebla tigrina*, organizm anhydrobiotyczny pochodzący z chilijskiej pustyni Atacama.

W części drugiej, Teorii, przedstawione zostały modele sorpcji wody uwzględniające różne efekty powierzchniowe, w tym izotermy sorpcyjne Langmuira, BET i GAB-Dent oraz skrócony opis podstaw teoretycznych zjawiska magnetycznego rezonansu jądrowego (MRJ). W szczególności omówiono w tym rozdziale procesy relaksacyjne możliwe do zaobserwowania przy pomocy spektroskopii i relaksometrii MRJ jąder wodoru ^1H . W części trzeciej, Materiały i Metody, omówiona została preparatyka próbek farmaceutycznych i ich ocena przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej, preparatyka próbek porostu anhydrobiotycznego, metoda wyznaczania kinetyki hydratacji metodą grawimetryczną, a także praktyczne aspekty wykorzystania metod pomiarowych MRJ - relaksometrii w polu 0,6T oraz spektroskopii w polu 7T, na jądрах ^1H . Trasy hydratacyjne (kinetyka hydratacji) Doktorant analizował przez dopasowanie od 1 do 3 funkcji eksponencjalnych. Wyniki pomiarów MRJ w domenie czasu analizował przez dopasowanie sumy funkcji Gaussa (jednej lub dwu) oraz funkcji eksponencjalnych (od jednej do trzech), zaś widma ^1H MRJ przez superpozycję funkcji Gaussa (jednej lub dwu) i Lorentza. W czwartej, najobszerniejszej części zostały przedstawione wyniki przeprowadzonych badań, w szczególności trasy kinetyki hydratacji oraz pomiarów relaksacyjnych i spektroskopowych dla poszczególnych grup badanych układów. Ponadto dla jednego z układów farmaceutycznych, mianowicie stałego rozproszenia tadalafilu w Soluplus w proporcji 1:1, dla trzech różnych poziomów uwodnienia, przedstawiono wyniki zależności temperaturowych relaksacji spinowo-sieciowej w polu 7T, uzyskane techniką spektroskopii relaksacyjnej. W części piątej zamieszczono obszerną dyskusję uzyskanych wyników, zaś w części szóstej sformułowano wynikające z badań wnioski.

W efekcie przeprowadzonych w okresie realizacji pracy i przedstawionych w rozprawie wyników badań, Doktorant stwierdził obecność w badanych układach, od jednej do czterech frakcji wody związanej (w zależności od równowagowego nasycenia wodą) oraz wyznaczył ich względne udziały oraz parametry relaksacyjne (T_1 , T_2) i spektroskopowe (szerokość i położenie linii widmowych ^1H MRJ). Ponadto dokonał interpretacji wyników, w kontekście obecności miejsc wiążących wodę do powierzchni stałej matrycy badanych układów. Z kolei na podstawie wyników badań zależności temperaturowych relaksacji spinowo-sieciowej układu tadalafil/Soluplus (w proporcji 1:1) w polu 7T, stwierdził obecność pośredniej wymiany spinowej w odwodnionym układzie, zaś szybkiej wymiany spinowej w układzie uwodnionym oraz wyznaczył parametry charakteryzujące siłę wiązania wodorowego. W przypadku plechy *Niebla tigrina* Doktorant oszacował zawartość frakcji rozpuszczalnej w wodzie.

Przedstawione w pracy wyniki badań stanowią interesujący przyczynek do poszerzenia wiedzy dotyczącej badanych układów. Rozprawa zredagowana jest zwięźle ale wystarczająco dokładnie aby czytelnik mógł zapoznać się zarówno z metodologią badawczą jak i osiągniętymi rezultatami. Zatem w mojej opinii, spełnia ona tradycyjne wymogi stawiane pracom doktorskim. Tym niemniej, podczas lektury tekstu pojawiło się kilka pytań na które chciałbym uzyskać odpowiedź.

1. W przypadku układów farmaceutycznych zwraca uwagę znaczna różnica w liczbie przebadanych próbek pomiędzy układami tadalafil/Soluplus a bozentan/kopowidon. Z czego wynikają te różnice? Wydaje się że tak duża liczba próbek dla pierwszego układu, różniących się warunkami sporządzania, (tab. III-1, str 45-46), była



przeznaczona do przeanalizowania wpływu tych warunków na własności próbek. Czytając pracę można odnieść wrażenie że ten aspekt (w szczególności wpływ procesu mielenia) nie został zbyt dogłębnie przeanalizowany. Ponadto wydaje się że nie wszystkie próbki wylistowane w tab. III-1 zostały ostatecznie przebadane, jeśli przyjrzeć się liście zamieszczonej w tab. III-3. Czy wynikało to z faktu że stwierdzone różnice we własnościach hydratacyjnych okazały się niewielkie?

2. Patrząc na wykres zależności L/S na rys. IV.14, zwłaszcza w przypadku czystego polimeru Soluplus, wydaje się że zależność od poziomu uwodnienia w zakresie od 0 do ok. 0,25 wskazuje na proces przechodzenia pewnej puli spinów do stanu o wyższej mobilności reprezentowanej przez składową L . Z opisu zachowania próbek wynika że powyżej poziomu uwodnienia ok. 0,3 obserwowana była zmiana z postaci proszkowej w hydrożel. W takiej sytuacji dość naturalnym byłoby założenie zwiększenia mobilności jakiejś części spinów. Czy podjęto próbę dopasowania funkcji wymiernej (która jest właściwa do opisu takiego zachowania) w tym zakresie uwodnień?
3. Na rys. IV.27 pokazano wynik dopasowania modelu BPP do zależności temperaturowej czasu T_1 w suchym układzie tadalafil/Soluplus, bardzo dobrze opisujący zakres powyżej wartości 3,7 w skali $1000/T$. Czy widoczne z lewej strony wykresu niewielkie boczne minimum, nieobjęte dopasowaniem, można zinterpretować jako odpowiadające innemu rodzajowi ruchów molekularnych lub innej grupie mobilnych jąder ^1H niż dopasowane minimum główne? Być może byłoby interesujące sprawdzić wynik dopasowania drugiego minimum w zakresie poniżej 3,7. W układach zawierających polimery, lub bardziej generalnie związki chemiczne zawierające grupy atomów wodoru o różnej mobilności obecność kilku minimów w zależności temperaturowej T_1 występuje dość często.
4. Czy do określenia położenia pików widm ^1H w domenie częstości stosowano jakiś wzorzec (zewnątrzny/wewnętrzny) o ustalonej częstości? Jak się wydaje w sporej części prezentowanych wyników rozrzut wartości tych położenia przekracza zaznaczoną wartość błędu. Czy może to wynikać z niestabilności dopasowania tego parametru do danych, czy przyczyną mogą być różne dla różnych pomiarów warunki dostrojenia pola B_0 i/lub prądów korekcyjnych?
5. Porównując wykresy FID na rys. IV.12 (tadalafil/Soluplus) i IV.18 (bozentan/kopowidon)) widać jest że w pierwszym przypadku dominującym efektem dla składowej mobilnej jest wpływ niejednorodności pola magnetycznego magnesu, co nie jest obserwowane w przypadku drugiego badanego układu. Czy taka różnica była obserwowana w całym zakresie uwodnień, dla obydwu przypadków? W jaki sposób była przeprowadzona analiza FIDu w przypadku obecności efektu niejednorodności? W szczególności czy uwzględniano człon opisujący wpływ dyfuzji w niejednorodnym polu magnetycznym który pozwoliłby dopasować krzywą w całym zakresie czasu?

W tekście pracy zdarzają się drobne niedoskonałości natury redakcyjnej, których kilka przytaczam z recenzenckiego obowiązku, między innymi: w kilku miejscach tekstu błędnie zapisane nazwisko Langmuira, przedstawione opisy i zawartość kolumn w tabeli III-2 na stronie 49, niejasna składnia ostatniego zdania na stronie 75, niewłaściwe numery rysunków w opisie w tekście na stronach 88 i 90, jak również pewne niekonsekwencje w stosowaniu skrótu MRJ versus NMR. Uchybienia te nie wpływają zasadniczo na jakość pracy która jako całość jest zredagowana dość starannie.



INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ
im. Henryka Niewodniczańskiego
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Niezależnie od sformułowanych powyżej pytań, wynikających przede wszystkim z mojej nie do końca zaspokojonej ciekawości badawczej, przedstawiona mi do recenzji praca jest interesującym przyczynkiem do określenia własności wody związanej w badanych układach. Jest przy tym zredagowana zwięźle i stosunkowo starannie. Zawartość rozprawy wskazuje że Doktorant opanował zarówno podstawy teoretyczne badanych zjawisk i stosowanych metod jak i praktyczne umiejętności ich zastosowania, co z sukcesem wykorzystał do przygotowania recenzowanej rozprawy.

W związku z powyższym stwierdzam że przedstawiona przez mgr Karola Kubatę rozprawa doktorska zatytułowana „Zachowanie śladowej wody związanej w układach farmaceutycznych i żywych organizmach anhydrobiotycznych” spełnia kryteria stawiane kandydatom w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz.U. z 2016 r. poz 882) i wnoszę o dopuszczenie mgr Karola Kubatę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Władysław Węglarz