

**POLITECHNIKA WARSZAWSKA  
WYDZIAŁ CHEMICZNY**

**ul. Noakowskiego 3  
00-664 Warszawa**

tel.: (0-22) 628 6359; (0-22) 234 7303

fax: (0-22) 234 7279; (0-22) 628 2741

E-mail: EVALA@CH.PW.EDU.PL

**Prof. dr hab. inż. Zbigniew Florjańczyk**

---

Warszawa, 19.08.2019

**Ocena rozprawy doktorskiej magistra inżyniera Rafała Bielasa zatytułowanej  
„Badania nad syntezą kopolimerów liniowych i szczepionych zawierających  
jednostki pochodnych chinoliny z wybranymi anionami o działaniu  
terapeutycznych, jako nowych układów biofunkcyjnych”**

Powierzona mi do recenzji rozprawa doktorska powstała na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w zespole Pani Profesor Doroty Neugebauer. Rozprawa ma tradycyjną formę zwartej opracowania z 3 obszernymi rozdziałami poświęconymi badaniom literaturowym, opisowi metodyki badań własnych oraz analizie uzyskanych rezultatów. Zawiera też inne elementy wymagane dla tego typu opracowań. Badania własne opisane w rozprawie stanowią fragment dużego projektu, którego celem jest wykorzystanie techniki kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu (ATRP) do syntezy funkcjonalnych materiałów polimerowych, a zwłaszcza kopolimerów amfifilowych, które można wykorzystać, jako nośniki substancji biologicznie czynnych. Ta tematyka jest obecnie bardzo intensywnie rozwijana w wielu ośrodkach badawczych gdyż wybrana metoda polimeryzacji pozwala łatwo kontrolować długość segmentów hydrofilowych i hydrofobowych oraz konstruować z nich makrocząsteczki o bardzo różnorodnej architekturze, co z kolei ma istotny wpływ na sposób samoorganizacji tych makrocząsteczek w środowisku wodnym oraz ich zdolność do immobilizacji, transportu i uwalniania substancji bioaktywnych. Pani Profesor Neugebauer jest jednym z współautorów podstawowej strategii stosowanej powszechnie w syntezie tego typu materiałów. Kluczowym elementem w tej strategii jest użycie

estrów kwasu metakrylowego i monoeterów glikoli polioksyetylenowych, jako źródła jednostek hydrofilowych. W ramach pracy doktorskiej pana magistra inżyniera Rafała Bielasa postanowiono przetestować możliwość wykorzystania do tego celu monomerów jonowych w postaci metakrylanów choliny. Pochodne choliny były już sporadycznie wykorzystywane do syntezy różnych biomateriałów, ale opracowanie metody ich kontrolowanej polimeryzacji i ocena przydatności otrzymanych materiałów jako potencjalnych nośników leków była na pewno oryginalnym i bardzo ambitnym interdyscyplinarnym wyzwaniem na pograniczu fizykochemii polimerów i biochemii.

Wątkiem wiodącym w części literaturowej rozprawy są zagadnienia związane z syntezą polielektrolitów o różnej architekturze cząsteczek, ich samoorganizacją w struktury nadcząsteczkowe oraz próbami ich wykorzystania w systemach kontrolowanego uwalniania leków. Był to na pewno dobry pomysł, gdyż pokazanie specyficznych cech tej grupy materiałów pozwala lepiej zrozumieć cel prowadzonych badań własnych i interpretację uzyskanych wyników. Jednak do tego opisu wkradł się pewien chaos, gdyż w pewnym momencie w rozdziałach mających w głównym tytule termin polielektrolit zaczęły się pojawiać informacje o wielu związkach, które polielektrolitami nie są na przykład o niejonowych kopolimerach amfifilowych lub innych kopolimerach, w których dochodzi do separacji faz. Te informacje powinny być przedstawione, jako osobne rozdziały. Ogólnie jednak lektura tego fragmentu pracy nie pozostawia wątpliwości, że autor na bieżąco śledzi postęp badań w tematyce pokrewnej jego własnym zainteresowaniom i jest w stanie ocenić wartość swoich osiągnięć na tle dokonań innych badaczy. Jak to zwykle bywa w tekście pojawiają się pewne dyskusyjne sformułowania takie jak na przykład bardzo modnym obecnie termin „polimeryczna ciecz jonowa”. W rzeczywistości określane tym mianem polimery nie są cieczami, lecz stałymi kationitami tyle, że z pewnym typem centrów kationowych i anionów. Ich cudowne właściwości przypisywane przez wielu badaczy, często nie wytrzymują próby w porównaniu z bardziej prostymi chemikaliami. Na przykład z ciecz jonowa opisana na stronie, 18 jako wspaniały katalizator cykloaddycji,  $\text{CO}_2$  do epoksydów jest w tym procesie mniej aktywna niż bromek sodu. Moim zdaniem trudno też oczekiwać, aby kationity mogły w przyszłości zastąpić chlorowodorki diamin (np. octanisept), jako środki przeciwdrobnoustrojowe gdyż polimery syntetyczne nie są na tyle dobrze

zdefiniowanymi substancjami, aby miały szansę obecnie przejść pomyślnie procedurę rejestracji leku.

Swoje własne badania doktorant rozpoczął od otrzymania obszernej biblioteki liniowych kopolimerów trzech pochodnych choliny z metakrylanem lub akrylanem metylu. Jego niewątpliwym sukcesem było znalezienie warunków, w których można było otrzymać z dobrą wydajnością produkty różniące się znacznie składem i masą molową. Niestety sposób wyznaczania tych parametrów nie został precyzyjnie opisany i nie można wykluczyć, że wyznaczone dane liczbowe są obarczone dużymi błędami. Już na samym wstępie odczuwa się brak charakterystyki stosowanych monomerów cholinowych. Doktorant po prostu przyjął, że po odpędzeniu wody z handlowego roztworu metakrylanu choliny z przeciwjonem chlorkowym otrzymał czysty bezwodny monomer oraz że udało mu się ilościowo zastąpić anion chlorkowy anionem bis(trifluorometanosulfo) imidkowym lub anionem salicylanowym. Trudno mi zrozumieć, dlaczego nie skorzystał ze standardowych metod stosowanych w chemii organicznej do oznaczania czystości otrzymywanych związków, choćby zwykłej analizy elementarnej czy metod spektroskopowych.

Skład i średnie liczbowo masy molowy otrzymanych polimerów oszacowano na podstawie stopnia konwersji monomerów wyznaczonej z widm  $^1\text{H}$  NMR mieszanin poreakcyjnych. W tej analizie założył, że pozostała część monomerów wbudowała się do łańcucha i każda makrocząsteczka zawiera jeden fragment inicjatora. To założenie jest w pracach z obszaru ATRP akceptowalne, natomiast należy się liczyć z dużymi błędami całkowania gdyż jak widać na jedynym przedstawionym w pracy widmie  $^1\text{H}$  NMR (rys.30) nie stosowano wzorca zewnętrznego, a sygnałami referencyjnymi były linie rezonansowe, charakterystyczne dla polimerów, dla których trudno jest precyzyjnie wyznaczyć granice całkowania. Ponadto przynajmniej w niektórych układach część monomerów cholinowych ulegała transestryfikacji, co powoduje, że ich rzeczywista zawartość w produkcie jest niższa od oszacowanej na podstawie konwersji monomerów. Moim zdaniem należało te szacunki zweryfikować, (choć by dla jednego produktu) oznaczając skład kopolimeru na podstawie zawartością węgla i azotu lub analizując widmo NMR wyodrębnionego polimeru. Dla wszystkich polimerów o budowie liniowej wyznaczono też pozorne masy molowe przy użyciu techniki GPC z wzorcami

polistyrenowymi. Jak można się było spodziewać wszystkie tak wyznaczone masy są dużo mniejsze od wyznaczonych metodą NMR. Wynika to ze znacznej różnicy średnic kłębków tworzonych przez wzorzec i polarne produkty badanych reakcji. Niepokoi natomiast fakt, że w kilku wypadkach nie ma nawet jakościowej zgodności pomiędzy danymi wyznaczonymi obydwoma metodami. Generalnie pomiar GPC w tym wariantcie służy jedynie do oceny stopnia dyspersyjności łańcuchów, który w większości wypadków był mniejszy, niż 1,5, co może wskazywać na dość dobrą kontrolę procesu polimeryzacji przez użyte kompleksy miedzi. Nie można jednak wykluczyć, że obecność silnie polarnych grup bocznych zakłóca proces rozdziału i że część łańcuchów zawierające grupy jonowe zostaje trwale zaabsorbowana na kolumnach chromatograficznych i rzeczywisty współczynnik dyspersji jest znacznie większy. W celu uzyskania bardziej wiarygodnych rezultatów należało wyeliminować boczne grupy jonowe wykorzystując zaobserwowaną reakcję transestryfikacji metanolem lub roztworem metanolanu sodu. Finalnym produktem byłby wówczas poli(metakrylan metylu), którego masę molową można precyzyjnie wyznaczyć metodą GPC. Potwierdzają to własne dane doktoranta uzyskane dla niepolarnych kopolimerów metakrylanu metylu zamieszczone w tabeli 10 na stronie 79 gdzie zgodność oznaczeń techniką NMR i GPC jest bardzo wysoka. Wspomniane powyżej ograniczenia każą z dość dużą ostrożnością podchodzić do dokonanej przez doktoranta próby oceny wpływu rodzaju przeciwjonu na reaktywność badanych monomerów tym bardziej, że punktem odniesienia nie były dane przy niskiej konwersji, co jest standardem w badaniach kinetycznych, a umowny punkt, w którym mieszadło przestawało się kręcić wskutek zbyt dużej lepkości mieszaniny reakcyjnej. W tych warunkach można się spodziewać, że bardzo istotny wpływ na reaktywność monomerów ma możliwość ich dyfuzji do centrów aktywnych i moim zdaniem ten aspekt należało uwypuklić gdyż zmiana przeciwjonu na dalekich peryferiach nie ma istotnego wpływu na reaktywność centrum aktywnego. Bardzo dobrą ilustracją są tu procesy polimeryzacji z udziałem monomeru z przeciwjonem imidkowym. Jest on bardzo aktywny w procesie homopolimeryzacji, co oznacza, że łatwo dociera do centrum aktywnego, gdy nie ma konkurenta. W obecności metakrylanu metylu jego reaktywność gwałtownie spada, gdyż silnie polarny ogon sprawia, że do centrów aktywnych dociera on z większym trudem niż mniejszy i mniej polarny metakrylan metylu. Z tego powodu

lokalne stężenia monomerów w pobliżu centrum rodnikowego są inne niż stężenia makroskopowe.

Część liniowych homopolimerów i kopolimerów została przez doktoranta zmodyfikowana w wyniku wymiany jonów, nie w monomerze, lecz w otrzymanych wcześniej polimerach o budowie liniowej z anionem chlorkowym lub salicylanowym. W tym teście chodziło o stwierdzenie czy tą drogą można efektywnie wprowadzać aniony o potencjalnym działaniu terapeutycznym ( w tym wypadku sulfacetamidowe) lub silnie polarne aniony imidkowe do gotowych matryc polimerowych otrzymanych z tańszych substratów. Autor twierdzi, że w badanych przez niego układach procesy wymiany biegły z bardzo wysoką wydajnością. Ja natomiast uważam, że wnioski te nie są wystarczająco udokumentowane. Doktorant wykazał, że w otrzymanych produktach są nowe aniony, ale nie udowodnił, że nie ma już starych lub że jest ich bardzo mało. Sprawdzenie obecności jonów chlorkowych lub salicylanowych nie jest trudne ( test z azotanem srebra czy sprawdzenie intensywności sygnałów protonów aromatycznych w widmie  $^1\text{H}$  NMR). Polimery zawierające w swojej strukturze grupy estrowe mają zdolność do tworzenia kompleksów z solami metali alkalicznych ( to zjawisko wykorzystuje się do tworzenia stałych elektrolitów polimerowych - patrz np. J. Phys. Chem. B, **2004**,108,14907). Nie można, więc wykluczyć, że w wyniku zastosowanych procedur otrzymano mieszaninę kopolimerów i soli metali z dwoma anionami. Na taką możliwość wskazują wartości temperatur zeszklenia uzyskane dla pochodnych z anionami imidkowymi. W produktach otrzymanych z odpowiedniego monomeru są one niskie wskutek znanego plastyfikującego działania anionu imidkowego. W produktach otrzymanych w reakcjach wymiany na matrycach polimerowych są one znacznie wyższe, co moim zdaniem jest związane z obecnością innych anionów, a nie różnic w rozkładzie sekwencji jak przypuszcza autor. Wystarczy tu sprawdzić dane dla homopolimerów, gdzie powinien występować tylko jeden rodzaj merów, a różnica wartości  $T_g$  wynosi aż  $98^\circ$ . W tym miejscu wyjaśnienia wymaga też co autor rozumie pod pojęciem ilościowe widmo  $^{13}\text{C}$  NMR na podstawie, którego stwierdził, że wymiana z udziałem anionów imidkowych biegnie z wydajnością ponad 95%. Brak o tym wzmianki w części eksperymentalnej, a wiadomo, że w tej technice intensywność sygnałów zależy od czasów relaksacji jader i nie wiadomo, co było wzorcem do pomiarów ilościowych.

Ostatnią grupą materiałów polimerowych otrzymanych przez doktoranta były kopolimery szczepione zawierające pochodne choliny w łańcuchach bocznych. W ich syntezie wykorzystano znaną metodę, w której jako inicjator stosuje się kopolimery bromoacyloksylowych pochodnych metakrylanu 2-hydroksyetylu. Podobnie jak poprzednio doktorant zdołał znaleźć warunki, które pozwoliły na otrzymanie oczekiwanych produktów w ilościach pozwalających na przeprowadzenia dalszych badań. Skala trudności syntezy była tu znacznie większa i uporanie się z tym zadaniem wskazuje i na głęboką znajomość niuansów techniki ATRP i umiejętność ich praktycznego wykorzystania. Siłą rzeczy charakterystyka tych produktów stwarzała jeszcze większe problemy niż w wypadku produktów liniowych. Nie jest, bowiem oczywiste założenia, że wszystkie atomy bromu w wyjściowym kopolimerze zostały wykorzystane do budowy bocznych łańcuchów i należy się liczyć z tym, że rzeczywista długość łańcuchów bocznych jest większa od wyliczonej.

Za najbardziej wartościową część pracy uważam cykl badań fizykochemicznych, którego celem była ocena zachowania otrzymanych polielektrolitów w środowisku wodnym oraz ich zdolności do immobilizowania i uwalniania substancji bioaktywnych. Badania prowadzone techniką rozpraszania światła, TEM i UV-vis jednoznacznie wykazały, że architektura makrocząsteczek zawierających pochodne choliny ma bardzo istotny wpływ na sposób ich agregacji. Kopolimery szczepione tworzą na ogół znacznie mniejsze agregaty o bardziej regularnym sferycznym kształcie niż ich analogi liniowe. Ponadto charakteryzują się niższymi wartościami krytycznego stężenia micelizacji, co jest korzystną cechą w aspekcie zastosowań w systemach kontrolowanego uwalniania leków. Bardzo trafnie wybrano i aniony o działaniu terapeutycznym i leki o charakterze niejonowym, a zgromadzony bardzo obszerny materiał doświadczalny został w sposób profesjonalny zinterpretowany. Dzięki temu doktorantowi udało się wskazać i możliwości i ograniczenia związane z tym nowym typem nośników polimerowych, co było jego podstawowym zadaniem. Generalnie wydaje się, że możliwości praktycznego wykorzystania tych układów nie są zbyt duże gdyż tzw. aniony terapeutyczne zawierające duży fragment organiczny (np. anion sulfacetamidowy) mogą stanowić bardzo solidną hydrofobową barierę dla cząsteczek wody, anionów nieorganicznych i leków, co znacznie ogranicza możliwość równoczesnego dostarczania jonowych i

niejonowych substancji biologicznie aktywnych. Z kolei cząsteczki leków zawierających sztywne układy aromatyczne mają problemy z przebicciem się nawet przez warstwę małych anionów i dla tego typu leków zdecydowanie lepszym nośnikiem są matryce zawierające niejonowe segmenty hydrofilowe. Z kolei małe jony chlorkowe mogą przepuszczać elastyczne i silnie polarne cząsteczki leków (np. erytromycynę), ale też silnie je wiązać i uniemożliwiać skuteczne ich uwalnianie. Jednak zachowanie układów zawierających aniony salicylanowe i erytromycynę pokazują, że przy pewnej optymalizacji układu terapia skojarzona z udziałem jonowych i niejonowych substancji biologicznie aktywnych jest przynajmniej teoretycznie możliwa.

Opisane w ostatniej części testy biochemiczne wykazały, że wybrane układy nie są toksyczne dla badanych linii komórkowych i nie wykazują aktywności prozapalnej. Niestety nie zaobserwowano też, spektakularnych efektów w działaniu antybakteryjnym, a w niektórych układach nastąpił nawet wzrost proliferacji.

W sumie, mimo szeregu krytycznych uwag odnośnie sposobu charakteryzowania mas molowych i składów otrzymanych polielektrolitów, uważam, że doktorant pomyślnie zrealizował bardzo wartościowy projekt badawczy. Przyjęte przez doktoranta pewne uproszczenia na tym etapie pracy można uznać za uzasadnione gdyż zakres prowadzonych badań był bardzo szeroki i trzeba było podejmować decyzje jak umiejętnie gospodarować niewielkimi ilościami próbek otrzymywanych materiałów, aby ocenić, jakie elementy strukturalne mogą być istotne przy projektowaniu tego typu układów. Ten podstawowy cel został osiągnięty, a do kwestii związanych z czystością produktów będzie można powrócić po wyselekcjonowaniu obiektów wartych bardziej szczegółowych badań.

Potwierdzeniem wysokiego poziomu pewnych etapów projektu badawczego opisanego w rozprawie doktorskiej mgr inż. Rafała Bielasa jest opublikowanie uzyskanych przez niego wyników w 2 artykułach, które ukazały się na łamach *New Journal Chemistry* oraz *Journal Molecular Liquids*. Dwie dalsze prace zostały przesłane do czasopism *Scientific Reports* i *Pharmaceutics*.

Na wyróżnienie zasługuje też bardzo bogaty całkowity dorobek naukowy doktoranta, który obejmuje 9 publikacji w cenionych periodykach oraz 14 prezentacji na konferencjach naukowych.

W tym stanie rzeczy nie mam najmniejszych wątpliwości, że autor recenzowanej rozprawy w pełni zasługuje na uzyskanie stopnia naukowego doktora nauk ścisłych w dyscyplinie nauki chemiczne w renomowanej Uczelni i z pełnym przekonaniem zwracam się do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej z wnioskiem o dopuszczenie magistra inżyniera Rafała Bielasa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Zbigniew Flejariński*