

Dr hab. Grażyna Adamus, prof. nzw. PAN
Email: grazyna.adamus@cmpw-pan.edu.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauliny Maksym zatytułowanej:

„Badania nad syntezą kopolimerów szczepionych zawierających segmenty polieterowe i ich wykorzystanie jako nośniki substancji biologicznie aktywne”

Praca doktorska Pani mgr inż. Pauliny Maksym została przygotowana na Wydziale Chemicznym w Katedrze Fizykochemii i Technologii Polimerów, Politechniki Śląskiej pod opieką promotorską Pani profesor dr hab. inż. Doroty Neugebauer.

Celem badań zrealizowanych w ramach niniejszej rozprawy było opracowanie metodologii syntezy kopolimerów o kontrolowanej architekturze, zawierających segmenty polieterowe, charakteryzujących się pożądanymi właściwościami fizykochemicznymi, zdolnych do formowania polimerowych systemów uwalniania wybranych substancji biologicznie aktywnych. Celowi pracy został przyporządkowany obszerny zakres przeprowadzonych badań, obejmujący syntezę i charakterystykę polimerowych nośników o zróżnicowanej topologii oraz weryfikację zdolności zaprojektowanych kopolimerów amfifilowych do formowania polimerowych systemów uwalniania wybranych substancji biologicznie aktywnych.

Cel pracy został dobrze zdefiniowany i doskonale wpisuje się w nurt badań nad nowymi materiałami polimerowymi dla zastosowań jako systemy dostarczania substancji biologicznie aktywne, w tym leków (DDS). Projektowanie struktury nośników substancji terapeutycznych jest jednym z najbardziej obiecujących sposobów umożliwiających poprawę właściwości farmakokinetycznych i biodystrybucji „klasycznych” i nowych leków. Na świecie opracowuje się obecnie ogromne ilości nowych DDS na bazie nośników polimerowych, w których substancja biologicznie aktywna może być zarówno związana chemicznie z nośnikiem poprzez wiązanie kowalencyjne (np. koniugaty polimer-lek) lub umieszczona w nośniku na zasadzie różnych interakcji fizycznych (np. mikrosfery, micle polimerowe, czy liposomy). Uważam, że wyzwanie podjęte w pracy przez mgr inż. Paulinę Maksym ma istotny wymiar naukowy i praktyczny, a wyniki uzyskane w ramach pracy powinny przyczynić się do rozwoju tak ważnej dziedziny jaką są badania nad systemami dostarczania substancji biologicznie aktywne.

Pani mgr inż. Maksym przygotowała rozprawę doktorską w tradycyjnej formie zwartej, liczącego 148 stron opracowania. Otwiera je krótkie *Wprowadzenie* (2,5 strony), po którym przedstawiono *Cel i zakres pracy* (2 strony), *Część literaturowa* (41 stron), *Część doświadczalna* (12

Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych jest instytutem Polskiej Akademii Nauk

tel. 32 271 60 77
faks 32 271 29 69
sekretariat@cmpw-pan.edu.pl
www.cmpw-pan.edu.pl

Nr rej. RIN-III-70/11
NIP: 648-000-67-14
Konto bankowe:
48 1130 1091 0003 9112 2420 0001

stron), *Omówienie wyników* (53 stron), *Wnioski i podsumowanie* (3 strony). Rozprawę kończy, *Streszczenie*, *Spis dorobku naukowego oraz Bibliografia*.

Układ rozprawy i proporcja poszczególnych rozdziałów jest więc typowy dla rozpraw doktorskich.

W *przeglądzie literaturowym* rozprawy, opierającym się na 197 pozycjach literaturowych, Autorka interesująco i kompetentnie przedstawiła obecny stan wiedzy na temat kopolimerów szczepionych oraz ich metod syntezy ze szczególnym uwzględnieniem metod kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej w tym ATRP. W dalszych rozdziałach Doktorantka omówiła właściwości kopolimerów amfifilowych oraz kopolimerów wrażliwych na bodźce. W ostatnim rozdziale tej części pracy Doktorantka omówiła zdolność samoorganizacji kopolimerów amfifilowych do różnych form strukturalnych oraz możliwości enkapsulacji i kontrolowanego uwalniania substancji aktywnych.

Dobór zagadnień omawianych w tej części jest logiczny, znajduje odniesienie w badaniach prowadzonych przez Doktorantkę, a przekazane informacje dobrze przygotowują czytelnika do zapoznania się z dalszymi częściami pracy. *Część literaturowa* pracy, została napisana w sposób ciekawy i świadczy o dobrej znajomości aktualnego stanu wiedzy Doktorantki dotyczącej uprawianej tematyki badawczej.

Z opisu *Części doświadczalnej* wynika, że czynności przygotowawcze, syntezy kopolimerów szczepionych oraz próby ich micelizacji zostały prawidłowo zaprojektowane i starannie wykonane. Doktorantka w przemyślny sposób dokonała wyboru metod analitycznych, które następnie wykorzystwała zarówno do monitorowania procesu syntezy makromonomerów, kopolimerów jak również do charakterystyki strukturalnej i molekularnej otrzymanych produktów końcowych oraz uzyskanych z nich miceli, co świadczy o kompetencjach Doktorantki i jej dużym doświadczeniu w pracy w laboratorium.

Przechodząc do części pracy „*Omówienie wyników*” pokrótce skomentuję kolejne etapy badań podejmowane przez Doktorantkę w dążeniu do osiągnięcia zaplanowanego celu. Jako metodę syntezy kopolimerów zawierających segmenty polieterowe o zróżnicowanej topologii Doktorantka wykorzystwała metodę kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu (ATRP). Syntezę kopolimerów szczepionych funkcjonalizowanych grupami hydroksylowymi P(PEGMA-co-MMA) i P(PPGMA-co-MMA) przeprowadziła z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych makromonomerów akrylanowych funkcjonalizowanych grupami hydroksylowymi (takich jak metakrylan glikolu polietylenowego (PEGMA), metakrylan glikolu polipropylenowego (PPGMA) oraz metakrylanu metylu) wobec klasycznego niskocząsteczkowego inicjatora polimeryzacji ATRP α -bromo izomaślanu etylu, przy udziale bromku miedzi (I) jako aktywatora i czynników kompleksujących na bazie amin.

Poprzez dobór początkowego stosunku makromonomer/monomer, komonomery/inicjator, dobór układów katalitycznych, temperatury, rodzaju i ilości rozpuszczalnika Doktorantka dążyła do zoptymalizowania warunków syntezy. W efekcie przeprowadzonych badań Doktorantka otrzymała kopolimery szczepione o zróżnicowanej średniej masie molowej, składzie i właściwościach fizykochemicznych.

W kolejnym etapie badań, nierozpuszczalne w wodzie kopolimery szczepione, w których udział metakrylanu glikolu polietylenowego (PEGMA) był mniejszy <5%mol lub w przypadku metakrylanu glikolu polipropylenowego (PPGMA) < 15%mol poddano trzy-etapowej modyfikacji. Pierwszy etap polegał na przekształceniu, na drodze estryfikacji grup hydroksylowych, nierozpuszczalnych w wodzie kopolimerów szczepionych w wielofunkcyjny makroinicjator ATRP, który następnie wykorzystano do polimeryzacji metakrylanu *tert*-butylu. Po zakończeniu polimeryzacji i acydolizie zabezpieczającej grupy karboksylowe Doktorantka otrzymała kopolimery szczepione o zwiększonej hydrofilowości P([MMA-co-(PEGMA-graft-PMAA)

Trzeci rodzaj kopolimerów, w których liniowy poliglikol etylenowy stanowiący jeden blok połączony jest z kopolimerem szczepionym stanowiącym drugi blok, otrzymano na drodze kopolimeryzacji metakrylanu glikolu polipropylenowego i metakrylanu metylu inicjowanej liniowym makroinicjatorem otrzymanym na bazie glikolu polietylenowego.

Konwersję komonomerów oraz stopień polimeryzacji wyznaczono za pomocą protonowego rezonansu magnetycznego oraz chromatografii gazowej. Modyfikacje określonych grup funkcyjnych potwierdzono techniką spektroskopii w podczerwieni FTIR, natomiast struktury i składy chemiczne otrzymanych kopolimerów stosując magnetyczny rezonans jądrowy (głównie protonowy). Liczbowo średnie masy molowe oraz dyspersyjności otrzymanych kopolimerów wyznaczono metodą chromatografii żelowej. Średnie masy molowe otrzymanych kopolimerów wyznaczono również w oparciu o widma protonowego rezonansu magnetycznego.

Uzyskane przez Doktorantkę kopolimery charakteryzowały się dużą różnorodnością zarówno pod względem składu, struktury jak i właściwości fizykochemicznych.

Aby zrealizować użyteczny cel pracy Doktoranta podjęta również wstępne badania nad możliwością praktycznego wykorzystania otrzymanych kopolimerów amfifilowych. Istotnym elementem tej części badań było poznanie i zrozumienie zjawisk zachodzących na poziomie oddziaływań molekularnych oraz przeprowadzenie oceny zdolności do samoorganizacji makrocząsteczek otrzymanych kopolimerów szczepionych w środowisku wodnym do struktur micelarnych. Realizując program badawczy Doktorantka wykazała, że otrzymane kopolimery mają zdolność tworzenia stabilnych struktur micelarnych, oceniła ich wielkość i wskaźnik dyspersji. Ponadto wykazała, że wielkość i stabilność otrzymanych struktur micelarnych zależy między innymi od topologii kopolimeru, długość łańcuchów głównego i bocznych, stopnia szczepienia, udziału komonomerów (hydrofilowego i hydrofobowego) oraz obecności polarnych grup hydroksylowych. W dalszych badaniach potwierdziła zdolność otrzymanych miceli do solubilizacji substancji aktywnej (indometacyna). Pozwala to sformułować przypuszczenie o możliwości wykorzystania opracowanych w ramach pracy kopolimerów do formowania systemów z których można uwalniać substancje aktywne tego rodzaju.

Omawiając wyniki uzyskane w ramach realizacji rozprawy doktorskiej Doktorantka nie ustrzegła się kilku błędów i nieścisłości językowych. Ilość błędów redakcyjnych i nieścisłości nie odbiega

jednak od średniej w tego typu pracach. W trakcie lektury nasunęło mi się kilka uwag, które z obowiązku recenzenta przytoczę i które chciałabym przedyskutować z Doktorantką w celu wyjaśnienia lub uzupełnienia zawartych w pracy informacji.

1. Moje zastrzeżenie budzi użycie przez Doktorantkę określenia „kopolimery półszczone” jako nazwy dla kopolimerów *mPEG-b-[P(MMA-co-PPGMA)]*, w których liniowy polimer w tym przypadku poliglikol etylenowy stanowiący jeden blok połączony jest z kopolimerem szczepionym [P(MMA-PPGMA)] stanowiącym drugi blok, poprawniejsze byłoby użycie nazwy kopolimery częściowo szczepione lub kopolimery blokowe o różnej topologii bloków (kopolimer liniowy-b-szczepiony).

2. W Tabelicy 7, s. 73 w której zamieszczono warunki syntezy oraz charakterystykę kopolimerów szczepionych funkcjonalizowanych grupami hydroksylowymi nie podano konwersji dla komonomeru MMA. Zamieszczona w Tabelicy 7 konwersja drugiego komonomeru (którym był metakrylan glikolu polietylenowego (PEGMA)) dla większości przeprowadzonych polimeryzacji była stosunkowo niska i mieściła się w zakresie 30-55%, co z pewnością rzutuje na wydajność otrzymywanych kopolimerów. W pracy nie zamieszczono jednak informacji dotyczącej wydajności otrzymanych kopolimerów szczepionych. Doktorantka wyjaśnia, że celem ograniczenia reakcji ubocznych, wynikających z obecności grup hydroksylowych oraz frakcji dimetakrylanowej w makromonomerze, reakcje polimeryzacji ATRP prowadzono do stosunkowo niskiego stopnia przereagowania komonomerów, a nieprzereagowany makromonomer usuwano z mieszaniny reakcyjnej za pomocą ultrafiltracji.

Co Doktorantka miała na myśli pisząc, że grupy hydroksylowe makromonomeru mogą ulegać ubocznej reakcji kondensacji?

Być może metodą pozwalającą na ograniczenie reakcji ubocznych byłoby zabezpieczenie grup hydroksylowych w makromonomerze, użycie do kopolimeryzacji zabezpieczonego komonomeru a następnie odbezpieczenie grup hydroksylowych w otrzymywanych kopolimerach szczepionych. Czy takie próby były podejmowane przez Doktorantkę w ramach przeprowadzonych badań?

3. Liczbowo średnie masy molowe oraz dyspersyjności otrzymanych kopolimerów szczepionych wyznaczono metodą chromatografii żelowej, wielkości te mogą być obarczone dużym błędem. Jest to typowy problem, na który napotyka się stosując technikę GPC do określenia mas molowych kopolimerów o nieliniowej topologii. Chociaż Doktorantka w dyskusji wyników zwraca uwagę, że różnice w wartościach M_n wyznaczonych metodą GPC i w oparciu o widma NMR wynikają z różnic w objętości hydrodynamicznej kłębka polimerowego makrocząsteczek badanych kopolimerów szczepionych w porównaniu z polistyrenowymi standardami, to jednak na podstawie wartości dyspersji wyznaczonych metodą GPC wyciąga wnioski dotyczące jednorodności struktury badanych polimerów. Ze względu na duże ograniczenia techniki GPC w zastosowaniu do analizy kopolimerów szczepionych, wartości średnich mas molowych oraz dyspersyjności wyznaczone tą metodą powinno się wykorzystywać głównie w celu oszacowania różnic w przypadku kopolimerów o zbliżonym składzie i stopniu szczepienia. Do otrzymanych w ramach pracy kopolimerów, w szczególności kopolimerów szczepionych z długimi

łańcuchami bocznymi lub o dużej gęstości szczeplenia, proponuję wykorzystanie w przyszłości metody rozpraszania światła, która obecnie jest już dość szeroko dostępna.

Przytoczone uwagi nie podważają w żadnej mierze wartości rozprawy i mojej bardzo pozytywnej jej oceny.

Podsumowując, uważam, że mgr inż. Paulina Maksym z dużym powodzeniem zrealizowała postawiony przed sobą cel pracy. Podjęte zadania badawcze zostały konsekwentnie zrealizowane i zasadniczo prawidłowo zinterpretowane. Uwzględniając aspekt poznawczy i aplikacyjny pracy uważam, że recenzowana praca spełnia kryterium nowości naukowej, w pracy przedstawiono wiele wartościowych wyników, które stanowią istotny wkład do rozwoju badań nad polimerowymi systemami dostarczania substancji biologicznie aktywnych. Warto nadmienić, że znaczna część uzyskanych w ramach realizacji pracy wyników została zawarta w czterech publikacjach opublikowanych w recenzowanych czasopiśmie znajdujących się na Liście Filadelfijskiej. Ponadto, oprócz 4 wymienionych prac, Doktorantka jest współautorką 3 innych publikacji w recenzowanych czasopiśmie znajdujących się na Liście Filadelfijskiej, 2 rozdziałów w monografiach oraz 18 prezentacji na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

Biorąc pod uwagę osiągnięte wyniki i sposób ich interpretacji uważam, iż przedłożona do recenzji praca doktorska mgr inż. Pauliny Maksym pt. *„Badania nad syntezą kopolimerów szczeplonych zawierających segmenty polieterowe i ich wykorzystanie jako nośniki substancji biologicznie aktywnych”* odpowiada w pełni wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim w świetle ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym (art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. Dz.U. z 2003 r., nr.65, poz. 595 z późniejszymi zmianami), i wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Pauliny Maksym do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony.

Jednocześnie z uwagi na wysoki poziom merytoryczny recenzowanej rozprawy doktorskiej oraz wartościowy dorobek naukowy Doktorantki, znacznie przekraczający wymagania stawiane kandydatom do uzyskania stopnia naukowego doktora, zwracam się z wnioskiem do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej o wyróżnienie Rozprawy Doktorskiej Pani mgr inż. Pauliny Maksym.



Gliwice, 31 sierpnia 2016 r.