

Dr hab. inż. Dorota Neugebauer, prof. PŚ  
Politechnika Śląska  
Wydział Chemiczny  
Katedra Fizykochemii i Technologii Polimerów  
ul. Strzody 9, 44-100 Gliwice  
e-mail: [dorota.neugebauer@polsl.edu.pl](mailto:dorota.neugebauer@polsl.edu.pl)

Gliwice, 14.08.2015

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Maksymiak

pt.: *Biodegradowalne materiały polimerowe jako nośniki związków biologicznie aktywnych*  
praca wykonana w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrze  
pod kierownictwem dr hab. inż. Grażyny Adamus, profesora PAN

Wysoko-wyspecjalizowane materiały inteligentne, ekomateriały i biomateriały o zastosowaniach docelowych w różnych dziedzinach wzbudzają szczególne zainteresowanie w obecnym stuleciu. Wśród nich uwagę skupiają związki wielkocząsteczkowe, które m. in. są stosowane jako nośniki aktywnych związków niskocząsteczkowych. Zakres badań naukowych z ich udziałem gwałtownie rozszerza się mając na celu zwiększenie kontroli działania tego typu układów, ich skuteczności dotarcia do określonego miejsca przy jednoczesnym ograniczeniu niepożądanych efektów ubocznych. Takie kryteria są szczególnie istotne w przypadku aktywności terapeutycznej leków, które w postaci układów micelarnych lub koniugatów są dostarczane do żywego organizmu. Koniugaty typu nośnik-lek zdefiniowano przy pomocy modelu Ringsdorfa w roku 1975. Od tego czasu opracowuje się coraz to nowocześniejsze układy, które wymagają zaprojektowania odpowiedniego nośnika polimerowego wykazującego biokompatybilność i zdolność do kontrolowanego uwalniania związku aktywnego. Jednak farmaceutyki to zaledwie jedna z wielu grup związków biologicznie aktywnych, do których zalicza się także substancje aktywne znajdujące zastosowania w przemyśle spożywczym, rolnictwie i kosmetyce, co znacznie poszerza zakres wykorzystania nośników polimerowych. Pomimo, iż badania nad zastosowaniem związków biologicznie aktywnych, z dużym naciskiem na leki, transportowanych za pomocą nośników polimerowych są prowadzone intensywnie od lat 80-tych, jednak postęp technologiczny wymusza ciągle doskonalenie właściwości użytkowych materiałów nie tylko przydatnych w farmakologii, przez co tematyka pozostaje atrakcyjna.

Zagadnienia podjęte w rozprawie doktorskiej przez mgr inż. Magdalenę Maksymiak w pełni wpisują się we współczesne trendy badań związków tworzących koniugaty ze związkami biologicznie czynnymi. Doktorantka zsyntezowała związki oligomerowe na bazie

$\beta$ -butyrolaktonu i jego  $\beta$ -podstawionych pochodnych przy użyciu bioaktywnych kwasów organicznych wykorzystując kontrolowaną polimeryzację anionową z otwarciem pierścienia. Mając na uwadze możliwość ich potencjalnego zastosowania w kosmetologii podjęła także próby ich degradacji hydrolitycznej oraz dostarczyła próbki otrzymanych materiałów do wstępnych badań biologicznych, aby zweryfikować ich biokompatybilność.

Rozprawa ma standardowy układ i liczy 142 strony, na które składają się następujące części: *Wprowadzenie* (2 strony), *Przegląd literatury* (39 stron), *Cel i zakres pracy* wraz ze spisem publikacji, które przedstawiają wyniki stanowiące przedmiot pracy (2 strony), *Omówienie wyników* (61 stron), *Podsumowanie i wnioski* z wypunktowaniem *Najważniejszych poznawczych wyników badań zawierających elementy nowości naukowej* (3 strony), następnie *Część eksperymentalna* (17 stron), po której znajduje się *Wykaz najczęściej stosowanych skrótów* (1 strona) i streszczenie w języku angielskim (1 strona). Na końcu umieszczona jest *Cytowana literatura* (10 stron) obejmująca 193 pozycje.

W *Części literaturowej* Autorka umieściła opis podstawowych układów kontrolowanego uwalniania leków jako związków biologicznie aktywnych z podziałem na micelle, liposomy, polimerosomy i kompleksy polimerów z DNA. Zwrócono także uwagę na znaczenie polimerów biodegradowalnych w medycynie i farmacji, do jakich należą alifatyczne poliestry, wśród których wyróżnia się poli(3-hydroksymaślanian). Ta grupa polimerów jest przedmiotem kolejnego rozdziału, gdzie wskazano na jej naturalne pochodzenie typowe dla biopolimerów. W dalszej części Doktorantka skupiła się na poli(3-hydroksymaślanie) (PHB) i jego laboratoryjnych metodach syntezy, tj. polimeryzacji koordynacyjnej i anionowej  $\beta$ -butyrolaktonu, kopoliestrach z  $\beta$ -podstawionymi  $\beta$ -laktonami. Po czym podjęto temat biodegradacji i biokompatybilności PHB wskazując na jego potencjał w zastosowaniach biomedycznych (układy uwalniania leków, resorbowalne implanty, podłoża hodowli komórkowych, bioresorbowalne materiały do opatrywania ran). Nawiązując do tematu pracy przedstawiono przykłady PHB stosowanego jako nośnik leków w postaci koniugatów. Ze względu na wskazane zastosowania biomedyczne PHB, szczególną zaletą jest jego zdolność degradacji do nieszkodliwych produktów niskocząsteczkowych wydalanych z organizmu lub biorących udział w procesach metabolicznych, a szybkość tego procesu jest ściśle uwarunkowana taktycznością polimeru i warunkami pH układu, na co też wskazuje wcześniejsze omówienie procesu hydrolizy estrów. Ponieważ związki biologicznie czynne to nie tylko leki, ale również substancje stosowane w kosmetologii, zatem omówiono także właściwości biologiczne kwasu  $\alpha$ -liponowego i oksydantów z grupy kwasów fenolowych. Szkoda, że Autorka nie podała przykładów wcześniej stosowanych nośników polimerowych dla biologicznie aktywnych kwasów

organicznych, co w istotny sposób uzupełniałoby zagadnienie omawianych koniugatów polimerowych. Ostatni rozdział tej części jest poświęcony zastosowaniu spektrometrii mas, w której wykorzystano jonizację techniką elektrorozpraszania (*electrospray ionization*, ESI), jako skuteczne narzędzie do badania struktury polimerów, w tym także biodegradowalnych. Doktorantka opracowała przegląd literaturowy na podstawie 177 pozycji, wśród których większość została opublikowana po roku 2000, a 19% stanowi artykuły z rodzimego ośrodka badawczego.

Omówienie wyników pracy doświadczalnej Pani Maksymiak rozpoczęła od syntezy i podstawowej charakterystyki koniugatów kwasu  $\alpha$ -liponowego i wybranych kwasów fenolowych, tj. kwasu anyżowego, wanilinowego, cynamonowego i *p*-kumarowego. W tym celu polimeryzację anionową przeprowadzono przy małych stężeniach początkowych  $\beta$ -butyrolaktonu w stosunku do inicjatora, którym była sól potasowa lub sodowa poszczególnych kwasów ( $[M]_0/[I]_0 = 5-20$ ). Oligo(3-hydroksymaślanu) (OHB) z wbudowaną jednostką inicjatora jako grupą początkową charakteryzowały się niskimi ciężarami cząsteczkowymi w zakresie 500-2100 g/mol jak oznaczono za pomocą GPC, które wykazywały dobrą korelację z wynikami NMR, a dodatkowo małe wartości dyspersyjności ( $\leq 1,23$ ) świadczyły o jednorodności łańcuchów. Szczegółowa analiza za pomocą ESI-MS oraz fragmentacja wybranych jonów molekularnych potwierdziła utworzenie koniugatów związków biologicznie aktywnych z OHB zawierających końcową grupę karboksylową jako główne produkty. Ponadto, zaobserwowano obecność stosunkowo małej ilości (5-7 % mol.) struktur bez jednostki biologicznie aktywnej, tj. w jej miejscu występowała grupa krotonianowa jako efekt ubocznej reakcji przeniesienia, jak i deprotonacji indukowanej udziałem karboksylanu. W niektórych przypadkach zaobserwowano struktury z początkową grupą hydroksylową ze względu na obecność zanieczyszczeń w postaci używanego do syntezy inicjatora KOH, który także wykazuje zdolności inicjujące w stosowanym układzie.

W kolejnym etapie w badaniach zastosowano  $\beta$ -podstawioną pochodną  $\beta$ -butyrolaktonu, tj. *p*-metoksybenzoiloksymetylopropiolakton, który zsyntezowano we współpracy z Instytutem Chemii Organicznej PAN w Warszawie (dalej zwany jako propiolakton). Warto zauważyć, że monomer ten w podstawniku zawiera jednostkę przyłączonego poprzez wiązanie estrowe kwasu anyżowego, co stanowi bardzo ciekawe rozwiązanie w syntezie bioaktywnych polimerów. Zarówno jego homopolimeryzację, jak i (ko)polimeryzację z  $\beta$ -butyrolaktonem wykonano w dwóch wariantach, z udziałem standardowego inicjatora octanu tetrabutylamonowego oraz inicjatora na bazie biologicznie aktywnego kwasu anyżowego. W obydwu przypadkach istnieje możliwość regulowania ilości wprowadzonego do oligomeru związku biologicznie aktywnego.

Homopolimeryzacja daje gwarancję otrzymania oligoestrów zawierających w każdym merze podstawniki anyżowe, których ilość można kontrolować poprzez odpowiedni stosunek stężenia początkowego monomer/inicjator, a dodatkowo zwiększać przez użycie inicjatora w postaci pochodnej kwasu. Natomiast w kopolimeryzacji statystyczna gęstość rozmieszczenia jednostek aktywnych jest mniejsza w porównaniu do analogowego homopolimeru o tym samym stopniu polimeryzacji, a stopień rozmieszczenia jest sterowany ilością nieaktywnego komonomeru. Struktury oligoestrów i kooligoestrów, tak jak poprzednio określono metodą ESI-MS, przy czym w przypadku tych ostatnich wykazano obecność 3 serii łańcuchów zakończonych grupami anyżową i karboksylową, dwie z nich różniły się 1 jednostką wbudowanego propiolaktanu i stanowiły zdecydowaną przewagę nad serią łańcuchów homooligoestrów OHB bez aktywnych podstawników, co jednak nie przeszkadza w ewentualnych zastosowaniach badanego układu.

Ze względu na przeznaczenie zsyntezowanych koniugatów niektóre z nich poddano procesowi degradacji hydrolitycznej, po kilku dniach badając zmiany jakie nastąpiły w strukturze łańcuchów polimerowych z użyciem metody ESI-MS. Produkty degradacji jednoznacznie wskazują na zwiększenie ilości wolnego kwasu w układzie.

Dodatkowo dla wybranych koniugatów przeprowadzono podstawowe badania biologiczne mające na celu zweryfikować ich przydatność w przyszłych zastosowaniach kosmetycznych, które wykonano w laboratorium kosmetycznym Centrum Naukowo-Badawczego Dr Ireny Eris i na Wydziale Farmaceutycznym Śląskiego Uniwersytetu Medycznego. Badania te obejmowały testy MTT (przeżywalność komórek), testy SRB (szybkość proliferacji), a przy użyciu mikroskopii świetlnej z kontrastem fazowym i spektroskopii Ramana połączonej z mikroskopią określono morfologię i zakres ich przenikalności przez warstwy skóry.

Wyniki obejmujące badania z zakresu pracy doktorskiej stanowią podstawę 2 złożonych wniosków patentowych oraz są opublikowane w 3 artykułach, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (IF 2,253), *International Journal of Mass Spectrometry* (IF 1,972) i *Acta Biomaterialia* (IF 6,025), przy czym ten ostatni jest po recenzji bez numeru DOI. W bazie *Web of Science* można wyszukać dwa inne artykuły, w których Pani Magdalena jest współautorką (*Analytica Chimica Acta*, IF=4,513 i *Journal of Materials Science*, IF=2,371), co świadczy o jej udziale w innych pracach zespołowych. Doktorantka powołuje się także na 20 wystąpień konferencyjnych w formie referatów i komunikatów, jednak bez zamieszczonego wykazu, nie jestem w stanie ustosunkować się do tych informacji. Ponadto Doktorantka była stypendystką projektu DoktoRIS i „Regionalnego Funduszu Stypendiów Doktoranckich 2” współfinansowanych ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki.

Tematyka badań prowadzonych przez mgr inż. Magdalenę Maksymiak jest bardzo ciekawa, otwiera nowe możliwości aplikacyjne. Przedstawiona praca eksperymentalna świadczy o umiejętnościach preparatywnych Doktorantki w zakresie syntezy oligomerów. Obszerna charakterystyka otrzymanych polimerów przy użyciu spektrometrii masowej wskazuje na posiadaną wiedzę, jaka jest niezbędna do zastosowania tej metody w badaniach i interpretacji widm do określenia struktur otrzymanych związków. Na podstawie wstępnych badań biologicznych dla wybranych koniugatów polimer-związek bioaktywny Doktorantka stwierdziła ich przydatność w dziedzinie kosmologii.

Odnosnie części omawiającej wyniki mam kilka uwag, które chciałabym przedyskutować w celu wyjaśnienia lub uzupełnienia podanych informacji:

1) Sól sodową kwasu anyżowego zastosowano w polimeryzacji propiolaktanu, a sól potasową tego samego kwasu w polimeryzacji  $\beta$ -butyrolaktanu, co prawda w części eksperymentalnej podano, że w tym ostatnim przypadku stosowano obydwie sole, jednak w pracy nie podano wyników. Czy rodzaj przeciwjonu soli wpływa na przebieg polimeryzacji i właściwości fizykochemiczne otrzymanych oligomerów?

2) Schemat reakcji, w wyniku której tworzą się łańcuchy oligomerów funkcjonalizowane grupami krotonianowymi został pominięty, chociaż wielokrotnie wspomina się o niej ze względu na powstający produkt uboczny reakcji.

3) Jakie są wartości ciężarów cząsteczkowych i dyspersyjność oligoestrów z podstawnikiem kwasu anyżowego?

4) Odnosnie degradacji hydrolytycznej polimerów:

i) w rozdz. 4.5.1. podano, że badania były wykonane „w warunkach laboratoryjnych w dejonizowanej wodzie oraz wybranych płynach fizjologicznych (m.in. w buforze fosforanowym o pH=5,5).”, jednak dalszy komentarz dotyczy pomiarów jedynie w wodzie o czym informuje podpis widm masowych. Jeżeli badania zostały wykonane także w innych warunkach to w jaki sposób wpływają one na degradację koniugatów? Podobnie, zgodnie z deklaracją koniugaty ze wszystkimi kwasami fenolowymi były poddane degradacji, ale wyniki ograniczają się jedynie do kwasu wanilinowego.

ii) ponadto Doktorantka podaje, że badała postępowanie degradacji w wodzie (3, 6, 24, 30, 48, 168, 336 godz.), podczas gdy porównuje wyniki ESI-MS próbki zerowej i po 7 dniach (168 godz.) dla koniugatu kwasu  $\alpha$ -liponowego lub 14 dniach (336 godz.) dla koniugatu kwasu wanilinowego. Jak wiadomo pierwsze godziny procesu są szczególnie ważne w określeniu charakteru degradacji.

iii) ilość uwolnionego kwasu oznaczona za pomocą HPLC podano dla jednej próbki, a jakie są wyniki dla pozostałych próbek? Czy uwolniona ilość kwasu jest zbliżona do tej jaka była umieszczona w koniugacie przed degradacją? Wyniki badań kinetyki pozwalają na sporządzenie profilu uwalniania kwasu w odniesieniu do czasu degradacji, dzięki czemu można udokumentować przebieg procesu, tym bardziej, że pewna ilość wolnego kwasu jest obserwowana bezpośrednio po rozpuszczeniu koniugatu.

v) degradację polimerów monitoruje się zazwyczaj poprzez ubytek masy próbki, wzrost dyspersyjności i spadek ciężaru cząsteczkowego (ten ostatni parametr w tym przypadku mniej przydatny ze względu na krótkie łańcuchy oligomerowe), które jako metody konwencjonalne mogą stanowić uzupełnienie analizy ESI-MS.

5) Czy obecność oligomerowego ogona w koniugacie w porównaniu z wolnym kwasem wpływa na proces przenikania przez skórę (głębokość) takiego układu?

6) W komentarzu do Rys. 27 stwierdzono obecność 2 serii łańcuchów, ale na widmie można dostrzec trzeci rodzaj sygnałów o bardzo małej intensywności, które w innych przypadkach były brane pod uwagę. Rozszerzenie widma, które jedynie w tym przypadku zostało pominięte z pewnością rozwiałoby wszelkie wątpliwości.

7) Niestety, Autorka nie uniknęła drobnych błędów podczas pisania pracy, m.in.: nieścisłości w informacjach typu, „oligomery OHB” sugerując oligomery oligomeru; „micelle są kuliste”, a w literaturze znajdują się liczne przykłady miceli cylindrycznych typu rdzeń-korona; „polimerosomy to struktury, w których rdzeń otoczony jest podwójną warstwą fosfolipidów”, to jaka jest różnica między polimerosomami a liposomami?; skrót koniugatu p-AA-OHB budzi wątpliwości, niekompatybilny z pozostałymi koniugatami, których styl jest uzasadniony, zapis p-AA-CH<sub>2</sub>-PL wprowadzono przy nazwie monomeru i oligoestru.

Podsumowując, cel pracy doktorskiej został osiągnięty, Doktorantka otrzymała oligomerowe koniugaty z udziałem bioaktywnych kwasów organicznych i zdefiniowała ich struktury za pomocą spektrometrii mas, co stanowi istotny wkład w badania nad nośnikami związków biologicznie aktywnych. Recenzowana praca spełnia kryterium nowości naukowej, co zostało udokumentowane artykułami opublikowanymi w czasopiśmie z listy filadelfijskiej o zasięgu międzynarodowym. Na tej podstawie stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia wymagania „Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym...” z dnia 14 marca 2003 r z późniejszymi zmianami i zwracam się do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Magdaleny Maksymiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kengebauer D.