

Zabrze, 3 listopada 2015r.

Dr hab. inż. Agnieszka Kowalczyk
Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Szafraniec

„Nanokapsuły polielektrolitowe z ciekłym rdzeniem do kontrolowanego podawania leków lipofilowych”

Praca doktorska pani mgr Joanny Szafraniec obejmuje otrzymywanie i badanie właściwości nanocząstek zbudowanych z polimerów szczepionych o charakterze amfifilowym oraz praktyczne wykorzystanie takich materiałów polimerowych do transportu małowcząsteczkowych substancji aktywnych.

Budowa oraz skład chemiczny polimerów amfifilowych o różnej topologii łańcuchów może być obecnie łatwo kontrolowana poprzez odpowiedni dobór nowoczesnych metod polimeryzacji. Zainteresowanie takimi makrocząsteczkami w biotechnologii oraz medycynie jest coraz większe ze względu na ich spodziewane wykorzystanie jako nanokontenerów zdolnych do transportu i uwalniania substancji biologicznie czynnych (w tym leków i proleków). Materiały polimerowe tego typu muszą spełnić szereg warunków, zarówno na etapie projektowania ich struktur i rozmiarów, jak i na poziomie badań określających ich nietoksyczność oraz biokompatybilność. Dlatego zaprojektowanie struktury kopolimeru, pełniącego funkcję nośnika dla cząsteczki substancji biologicznie aktywnej, stanowi wyzwanie dla współczesnej nauki o polimerach.

Kopolimery szczepione, użyte przez Autorkę pracy do budowy nanocząstek, składały się z hydrofilowych łańcuchów głównych poli(2-akryloamido-2-metylo-1-propanosulfonianu sodu) lub chlorowodoru polialliloaminy oraz bocznych hydrofobowych łańcuchów poliwinylonaftalenu. Kopolimery o odpowiedniej gęstości szczepienia i odpowiednim stopniu polimeryzacji łańcu-

chów bocznych okazały się być zdolne do tworzenia dobrze zdefiniowanych nanokapsuł w procesie emulsyfikacji wodnych roztworów polimerów z fazą olejową. Przeprowadzone badania pozwoliły na enkapsulację w olejowych rdzeniach utworzonych nanokapsuł lipofilowych sond fluorescencyjnych. Ze względu na planowane zastosowanie nanokapsuł w medycynie, w badaniach *in vivo* doktorantka zdecydowała się zastąpić syntetyczne polimery pochodnymi chitozanu oraz kwasu hialuronowego modyfikowanymi łańcuchami alkilowymi.

Temat podjętych przez Autorkę badań jest bardzo interesujący zarówno pod względem poznawczym, jak i istotny ze względu na potencjalne użycie takich systemów polimerowych do kontrolowanego dostarczania a następnie uwalniania substancji bioaktywnych. Należy zauważyć, że otrzymywanie polimerów przy użyciu nowoczesnych metod polimeryzacji kontrolowanych i żyjących oraz charakterystyka takich struktur jest przedmiotem prac wielu grup badawczych. W wielu pracach zachowanie uzyskanych makrocząsteczek w roztworach, rzutujące na ich potencjalne zastosowanie jako nośników, jest jednak niewystarczająco wyjaśniane, a często wręcz pomijane. Brakuje często informacji o tym, czy w roztworze znajdują się izolowane makrocząsteczki czy ich agregaty.

Celem pracy pani mgr Szafraniec było takie zaprojektowanie struktur polimerowych na poziomie molekularnym, aby spełniały one wymagania stawiane nanonośnikom polimerowym do zastosowań biomedycznych. Samoorganizacja otrzymanych modelowych kopolimerów o charakterze amfifilowym w roztworach wodnych została w pełni przebadana, co pozwoliło na wykorzystanie uzyskanych wyników do konstrukcji nanośników zbudowanych z polisacharydów i ich użycie do badań *in vivo*. Z pracy pani mgr Szafraniec jasno wynika jak ważne jest powiązanie parametrów struktury kopolimerów, szczególnie liczby i długość bloków hydrofobowych szczepionych na hydrofilowym łańcuchu głównym z zachowaniem kopolimerów w roztworach. W badaniach doktorantka uwzględniła również wpływ zmiany pH na rozmiar uzyskiwanych struktur. Krytyczna analiza otrzymanych wyników wraz z uzyskaną wiedzą na temat procesów samoorganizacji w połączeniu z badaniami strukturalnymi pozwoliła osiągnąć wydajną enkapsulację modelowych związków fluorescencyjnych w wybranych nanokapsułach. Jest to niewątpliwie ważne osiągnięcie doktorantki.

Bardzo istotny jest również połączenie w przedstawionej pracy doktorskiej elementów badań podstawowych; obejmujących otrzymywanie kopolimerów i badanie ich organizacji w roztworach wodnych z badaniami o charakterze aplikacyjnym; dotyczącymi potencjalnego zastosowania otrzymanych nanonośników do kontrolowanego transportu substancji hydrofobowych. Interdyscyplinarność pracy łączącej badania z zakresu chemii polimerów z możliwymi zastosowaniami w medycynie w dużym stopniu podnosi jej wartość. Wyniki uzyskane w pracy zostały

opublikowane w dwóch artykułach w dobrych czasopismach z Listy Filadelfijskiej, a także są tematem zgłoszenia patentowego. Ukażą się również dwie kolejne publikacje. Wyniki pracy zostały również zaprezentowane na 20 konferencjach międzynarodowych i krajowych. Fakt finansowania tego typu badań z projektów Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki świadczy o tym że podjęty problem badawczy jest istotny dla współczesnej nauki. Przedstawiona rozprawa stanowi, moim zdaniem, wartościowe osiągnięcie naukowe, bez wątpienia zawierające istotne elementy nowości naukowej.

Obszerna, licząca 150 stron praca składa się z trzech części: literaturowej, doświadczalnej oraz dyskusji nad wynikami badań.

Założenia i cel pracy zostały jasno sformułowane, pozwalając czytelnikowi w prosty sposób zapoznać się z tematyką pracy. Opis stanu wiedzy zamieszczony we wprowadzeniu literaturowym jest gruntownie zaplanowany i logicznie uporządkowany. We wprowadzeniu literaturowym Autorka bardzo wnikliwie omawia zagadnienia badawcze stanowiące podstawę podjętej tematyki. Przegląd literatury obejmuje zarówno klasyfikację polimerów z uwzględnieniem ich architektury, jak i opis technik polimeryzacji z uwzględnieniem kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej z użyciem związków nitroksylowych, zastosowanej w pracy. Autorka omawia także różne rodzaje polimerowych nanoosników substancji aktywnych, poruszając szczegółowo zagadnienia dotyczące otrzymywania oraz własności nanokapsuł polimerowych z tzw. ciekłymi rdzeniami.

Niezależnie jednak od mojego uznania dla wysokiej wartości merytorycznej pracy, z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na kilka nieprecyzyjnych fragmentów pracy oraz na kilka spraw dyskusyjnych.

W części literaturowej, a w szczególności w rozdziale dotyczącym kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej zostały bardzo szczegółowo omówione zasady kontrolowania polimeryzacji. Autorka przedstawiła różne typy stosowanych stabilnych rodników nitroksylowych – pochodnych rodników TEMPO. Wiadomo, że z wykorzystaniem tej metody można polimeryzować różnego typu monomery zawierające w swojej budowie wiązanie winylowe. Autorka nie podała jednak ani jednego przykładu monomerów zdolnych do tego typu polimeryzacji. Ta sama uwaga dotyczy rozdziału o polimerach amfifilowych, gdzie zabrakło chociażby wzmianki o podstawowym przykładzie kopolimeru zawierającego bloki hydrofobowe i hydrofilowe, jak np. polistyren-*b*-poli(tlenek etylenu).

Warto również zauważyć, że utworzenie stabilnego rdzenia można uzyskać nie tylko poprzez zastosowanie kopolimeru amfifilowego o odpowiedniej strukturze, o czym autorka wspomina w rozdziale 1.7, ale również poprzez wprowadzenie do rdzenia związków zawierających odpowiednie grupy funkcyjne, które umożliwią jego usieciowanie.

Myślę, że dość niefortunnie sformułowana została również przedstawiona definicja przeniesienia aktywności łańcucha oraz terminacji poprzez rekombinację i dysproporcjonowanie w opisie mechanizmu polimeryzacji rodnikowej (rozdział 1.4).

Podana przez Autorkę w rozdziale 3.1.3 definicja nanocząstek polimerowych nie jest wystarczająco ogólna. Przytoczone jako przykłady polimerów tworzących nanocząstki poli(kwas mlekowy) i poli(kwas glikolowy) to polimery biodegradowalne, a nie jak pisze Autorka niebiodegradowalne.

Użyta na stronie 36 nazwa angielska efektu EPR czyli zjawiska zwiększonej przepuszczalności naczyń i zatrzymywania cząstek o odpowiednim rozmiarze w tkance guza jest nieprawidłowa.

Moje wątpliwości budzi również interpretacja zmiany rozmiaru nanocząstek utworzonych przez kopolimery szczepione zawierające główny łańcuch dodatnio naładowanego chlorowodoru polialliloaminy i łańcuchy boczne poliwinylonaftalenu spowodowana zmianą pH roztworu. Autorka zauważa, że w roztworach o pH=3, gdzie użyty polimer kationowy jest w pełni zjonizowany otrzymuje agregaty o mniejszym rozmiarze niż w pH=7, w którym chlorowodorek polialliloaminy jest częściowo zdeprotonowany. Fakt większego rozmiaru nanocząstek w pH=7 tłumaczony jest „rozciągnięciem” łańcuchów. Wiadomo jednak, że w warunkach kwasowych, wraz ze zmniejszaniem wartości pH, na wskutek elektrostatycznego odpychania się naładowanych grup aminowych następuje rozprostowywanie się łańcuchów polimerów kationowych skutkujące zwiększeniem rozmiarów. W zasadowych wartościach pH, wraz z jego zwiększaniem, deprotonowanie i tworzące się wiązania wodorowe pomiędzy grupami aminowymi początkowo prowadzą do zmniejszenia się rozmiarów nanostruktur. Na skutek zwiększenia oddziaływań hydrofobowych uzyskane struktury mogą jednak oddziaływać ze sobą tworząc większe agregaty, a w skrajnym wypadku polimer może wytrącić się z roztworu. Czy uzyskane przez Autorkę wyniki nie sugerują raczej takiego zachowania kopolimeru szczepionego w pH=7?

W rozdziale Autorka stosuje określenia będące żargonem laboratoryjnym np. str. 64 „po 8 dni na każdy rozpuszczalnik” czy na str. 19 „z łatwością generowania rodników (..) w parze idzie utrudniona kontrola”. Pojawiają się również drobne błędy redakcyjne jak np. str. 22 samoterminacja, str. 36 poliglokolid. Ilość tych błędów jest jednak znikoma i nie prowadzi do nieporozumień merytorycznych, dowodząc staranności w pisaniu pracy.

Wymienione powyżej uwagi krytyczne dotyczą jednak spraw drugorzędnych lub mają wyłącznie charakter dyskusyjny, a zauważone drobne usterki nie wpływają na moją wysoką ocenę pracy doktorskiej.

Praca doktorska pani mgr Joanny Szafraniec obejmuje bardzo istotne zagadnienia badawcze zarówno z punktu widzenia poznawczego, jak i aplikacyjnego. Założone cele badawcze pracy zostały w pełni zrealizowane. Praca stanowi duży wkład do stanu wiedzy na temat nanonośników polimerowych do potencjalnych zastosowań w medycynie.

Stwierdzam, że przedstawiona praca spełnia odpowiada na wymagania Ustawy z dnia 14 marca 2010 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki w odniesieniu do rozpraw doktorskich. W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie pani mgr Joanny Szafraniec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Agnieszka Kasalnik