

dr hab. Teresa Basińska, profesor CBMiM PAN
Dział Funkcjonalnych Polimerów i Materiałów Polimerowych
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112
90-363 Łódź
tel. (42) 6803235
e-mail: teresa.basinska@cbmm.lodz.pl

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr inż. Marii Kupczak

**wykonanej w Katedrze Fizykochemii i Technologii Polimerów
Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej**

Otrzymywanie i charakterystyka wybranych właściwości miktoramiennych polimerów gwiazdzistych zawierających segmenty degradowalnych poliestrów

Przedstawiona do recenzji praca, wykonana pod opieką prof. dr hab. inż. Doroty Neugebauer i dr inż. Anny Mielańczyk w roli promotora pomocniczego ma układ klasyczny i obejmuje – łącznie z bibliografią, spisem tabeli i rysunków - 142 strony. Rozprawa doktorska w swoim podstawowym i zarazem klasycznym układzie, składa się ze wstępu i opisu celu pracy, części literaturowej, części eksperymentalnej, zawierającej opisy metod i procedur wykonanych cykli doświadczeń, omówienia wyników poszczególnych zrealizowanych zagadnień, podsumowania i wniosków oraz bibliografii, składającej się ze 180 pozycji literaturowych, zawierających numery DOI.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została napisana w sposób logiczny i spójny. Zagadnienia poruszane w pracy – synteza i badanie właściwości miktoramiennych kopolimerów gwiazdzistych - są bardzo aktualne i dobrze wpisują się w nurt badań prowadzonych na świecie na ten temat. Jednocześnie, podjęta tematyka badawcza wymaga połączenia wiedzy o polimerach i umiejętności analizy rezultatów badań uzyskiwanych za pomocą różnych technik i metod analitycznych. W związku z tym, nie należy do łatwych i stanowi wyzwanie dla badacza. Klasyczne metody analityczne, np. chromatografia cieczowa, pomocne w charakterystyce polimerów mają pewne „niedoskonałości”, ze względu na kształt i różnorodność właściwości polimerów składających się na jeden obiekt i tym samym, złożoność układu. Ponadto, bardzo często, makrocząsteczki miktoramiennych kopolimerów mają kształt anizotropowy, odbiegający od sferycznego, ze względu na różne frakcje

łańcuchów polimerowych o strukturze i stopniu polimeryzacji odbiegającym od pozostałych łańcuchów polimerowych oraz oddziaływania między miktoramiennymi gwiazdami powodujące tworzenie dubletów lub multipletów miktoramiennych gwiazd, które w znaczący sposób wpływają na uzyskane masy molowe i rozrzuty mas molowych. Dodatkowo, uwzględniając przyszłe zastosowanie kopolimerów gwiazdzistych w postaci nośników leków, rozrzuty mas molowych w znaczący sposób mogą wpływać na migrację do komórek docelowych i uwalnianie związków biologicznie czynnych. Niewątpliwą zaletą zaprojektowanych obiektów jest połączenie dwóch klas polimerów – reagujących na bodźce i biodegradowalnych. Ponadto, współczesne metody polimeryzacji umożliwiają zsyntetyzowanie układów (obiektów) złożonych z polimerów o zaprojektowanych właściwościach (masie molowej, strukturze, itp.), uzyskanych w procesach przebiegających jednocześnie, według różnych mechanizmów.

Nieliniowe kopolimery wciąż znajdują liczne grono badaczy, ze względu na możliwość ich wykorzystania do wielu biomedycznych zastosowań, w tym, nośników leków o kontrolowanym uwalnianiu w miejscu docelowym w organizmie. Ze względu na wielorazowe podawanie niektórych substancji leczniczych wspomniane leki dozowane z nośników są bardzo pożądane w nowoczesnych terapiach np. zwalczających nowotwory.

Celem pracy doktorskiej p. mgr inż. M. Kupczak było zsyntetyzowanie i scharakteryzowanie 1) kopolimerów gwiazdzistych otrzymanych z metakrylanu N,N-dimetyloaminoetylu (PDMAEMA) i metakrylanu 2-hydroksyetylu (PHEMA); 2) liniowych poliestrów alifatycznych złożonych z ϵ -kaprolaktonu, polilaktydu i kopolimeru polilaktydu-poliglikolidu; 3) miktoramiennych polimerów gwiazdzistych złożonych z łańcuchów polimerów hydrofilowych, np. pHEMA i hydrofobowych biodegradowalnych, np. poli(ϵ -kaprolaktonu), polilaktydu, poliglikolidu. Rdzenie kopolimerów gwiazdzistych zaprojektowane były z usieciowanego dimetakrylanu glicerolu (GDMA) oraz mono- lub dwucukrów takich jak glukonamid i laktobionamid. Doktorantka zaplanowała także zbadanie możliwości zastosowania otrzymanych kopolimerów w terapii łuszczycy, stosując na naskórek koniugat kopolimeru gwiazdzistego, zawierającego jednostki DMAEMA lub HEMA i leku acytretyny lub metotreksatu.

Część literaturowa zawiera m.in. przykłady zastosowań polimerów odpowiadających na bodźce (np. termoczulych i pH) wykorzystanych do różnego rodzaju zastosowań w postaci materiałów biomedycznych. W części wstępnej tego rozdziału, moim zdaniem, zabrakło podstawowych informacji na temat mechanizmu powstawania tzw. temperatury krytycznej niektórych polimerów oraz listy polimerów, które wykazują tzw. niższą krytyczną

temperaturę rozpuszczania (z ang. LCST). W dalszej części omówione są metody syntezy polimerów i kopolimerów wrażliwych na temperaturę i pH, w szczególności pDMAEMA i pHEMA o różnej architekturze. W dalszych rozdziałach omówione są metody syntezy miktoramiennych polimerów gwiazdzistych, złożone z różnych polimerów, poprzez nie tylko różne rodzaje kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej, takie jak RAFT, ARGET ATRP, i in., ale także żyjącej polimeryzacji anionowej. Omówione są różne strategie otrzymania miktoramiennych kopolimerów gwiazdzistych takie jak *coupling onto*, *one pot*, *in-out* i inne. Autorka rozprawy zapoznaje czytelnika z nowoczesnymi „narzędziami” chemika - *click chemistry*, pomocnymi w przygotowaniu zaprojektowanych obiektów wieloramiennych, tj. wbudowania ramienia do istniejącego polimeru gwiazdzistego. Doktorantka wykazała się dobrą znajomością metod syntezy kopolimerów o różnej strukturze, a także zacytowała prace dobrze ilustrujące przedstawiane procesy syntetyczne.

Oddzielny rozdział został poświęcony polimerom biodegradowalnym. W części wstępnej zabrakło mi wyjaśnienia pojęć stosowanych takich jak biodegradacja czy biokompatybilność, przedstawienia wzorów strukturalnych choćby wybranych polimerów biodegradowalnych, a także, bardziej precyzyjnych informacji związanych z biodegradacją polimerów, choćby wspomnienia o konkretnych produktach degradacji i przedstawienia relacji struktura-właściwości w aspekcie stosowania polimerów biodegradowalnych w postaci nośników związków aktywnych biologicznie.

Ostatni podrozdział w tej części zawiera informacje dotyczące zastosowań miktoramiennych biodegradowalnych polimerów gwiazdzistych i ich amfifilowych pochodnych do projektowania układów do transportu i kontrolowanego uwalniania leków pod wpływem zmian pH lub temperatury.

W części eksperymentalnej opisane są zastosowane materiały, ligandy, katalizatory i inne reagenty stosowane w syntezach oraz procedury prowadzące do otrzymania różnymi metodami zaprojektowanych polimerów i kopolimerów. W rozdziale przedstawione są kolejno, procedury przeprowadzenia syntez miktopolimerów gwiazdzistych metodą *coupling*, *one-pot*, *in-out*, a następnie, metody analityczne prowadzące do scharakteryzowania uzyskanych polimerów i kopolimerów o różnej architekturze.

Interesujące są rezultaty badań kopolimerów gwiazdzistych zawierających PDMAEMA i PHEMA, zależnie od temperatury lub pH roztworu, w jakim się znajdują. Doktorantka wykazała, że skład polimeru jest ściśle związany z temperaturą krytyczną (T_{CP}). W wypadku kopolimerów z większym udziałem jednostek powtarzalnych HEMA, T_{CP} kopolimeru w roztworze była niższa, niezależnie czy kopolimer był w wodzie czy buforze PBS. Jednakże, w

wypadku homopolimerów o porównywalnych długościach łańcuchów, PHEMA wykazuje niższe wartości T_{CP} . Jednakże, Doktorantka zauważyła, że różnice w wartościach T_{CP} w wypadku homopolimerów PHEMA i PDMAEMA w wodzie i PBS, były ściśle związane z pH badanych roztworów. Szkoda, że analizując średnice hydrodynamiczne kopolimerów gwiaździstych nie wykreślono zależności np. T_{CP} względem frakcji molowej PHEMA w kopolimerze. Można by w ten sposób zbadać, jaki ma wpływ bardziej hydrofilowy komponent kopolimeru gwiaździstego na T_{CP} .

W dalszej części rozdziału przedstawione są rezultaty badań koniugatów kopolimerów gwiaździstych z lekami. Koniugaty zostały otrzymane przez utworzenie wiązań estrowych między bocznymi grupami hydroksylowymi w ramionach polimerów gwiaździstych i grupami karboksylowymi leku (np. metotreksatu lub acytretyny) za pomocą odpowiednich katalizatorów. Przeprowadzono analizę histologiczną próbek skóry traktowanych zsyntetyzowanymi koniugatami. Rezultaty badań biologicznych wskazały na brak toksyczności i działanie przeciwnowotworowe koniugatów (zwalczające komórki nowotworowe).

W dalszej części Doktorantka zsyntetyzowała i scharakteryzowała miktoramienne kopolimery gwiaździste zawierające jednostki powtarzalne DMAEMA i HEMA za pomocą kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej ARGET ATRP.

Na przykład, w wypadku kopolimerów 5-ramiennych współczynnik dyspersji wyniósł 1,6, co świadczy o dobrej kontroli polimeryzacji. W wypadku wspomnianych 5-ramiennych kopolimerów wyznaczono również temperaturę krytyczną T_{CP} , której wartości były zależne od masy molowej i frakcji molowej poszczególnych komonomerów w kopolimerze.

W kolejnej części pracy omówione są badania syntezy i przeprowadzenia charakterystyki miktoramiennych semi-degradowalnych kopolimerów zawierających ramiona biodegradowalne polilaktydu, poli(laktydu-co-glikolidu), poli(ϵ -kapolaktonu), poli(laktydu-co-glikolidu-co- ϵ -kapolaktonu). P. mgr inż. Kupczak zastosowała 3 podejścia syntetyczne, aby zoptymalizować warunki syntezy 6-0 i 9-0 miktoramiennych kopolimerów o kontrolowanej masie molowej i architekturze. Na szczególną uwagę zasługuje synteza kopolimerów metodą *one-pot*, w której, do uzyskania miktoramiennego kopolimeru częściowo biodegradowalnego, jednocześnie zastosowała polimeryzację anionową i kontrolowaną rodnikową typu ATRP. Dodatkowo, w tym samym naczyniu, zastosowała *click chemistry* w celu związania „ramienia” biodegradowalnego z zsyntetyzowanym kopolimerem gwiaździstym. W wypadku uzyskania omawianych kopolimerów o większym współczynniku dyspersji, znacznie odbiegającym od monodispersyjności lub niemonomodalnym rozkładzie

mas molowych mierzonym za pomocą SEC, Doktorantka podjęła próby wyjaśnienia niejasności. Świadczy to o dużej wiedzy Doktorantki i wysokich umiejętnościach całego spektrum metod syntezy i przeprowadzania charakterystyk złożonych układów polimerowych.

W wypadku wybranych miktoramiennych kopolimerów zawierających biodegradowalne poliestry, wyznaczyła także zależności transmitancji od temperatury, świadczące o przemianie fazowej wybranych kopolimerów w wodzie i buforze PBS.

Ponadto, zbadala częściową degradację hydrolityczną lub enzymatyczną miktoramiennych kopolimerów zaw. frakcje biodegradowalnych poliestrów i zanalizowała kopolimery na różnych etapach degradacji za pomocą SEC i skaningowej kalorymetrii różnicowej (ang. DSC). Bardzo interesująca była obserwacja, że obecność segmentu hydrofilowego w miktoramiennych kopolimerach gwiazdzistych ma wpływ na szybkość degradacji układu. Degradacja kopolimeru w środowisku kwaśnym przebiega szybciej, gdy obecne są w kopolimerze ramiona polimeru zawierającego czwartorzędowe kationy amoniowe, zwiększające rozpuszczalność kopolimeru w wodzie.

Pomimo mojej pozytywnej opinii o pracy, z racji pełnienia funkcji recenzentki pozwolę sobie zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia i nieścisłości zauważone w pracy.

Doktorantka zsyntetyzowała i zbadala właściwości fizykochemiczne wieloramiennych obiektów polimerowych. Powstają jednak pytania do dyskusji podczas obrony pracy: i) czy stosując podobne narzędzia chemiczne byłoby celowe zsyntetyzowanie polimerów gwiazdzistych, o wzrastającej liczbie ramion i wówczas dokonanie porównania własności kopolimerów względem ich odpowiedników o podobnych masach molowych, zmieniając ich skład chemiczny; ii) co było przyczyną zaprojektowania udziałów molowych polimerów biodegradowalnych w miktoramiennych kopolimerach gwiazdzistych? czy nie powinny one być znacznie większe, biorąc pod uwagę przyszłe zastosowania biomedyczne tych układów?

W tabeli 10 przedstawione są dane charakteryzujące koniugaty kopolimer-lek. Na uwagę zwracają duże różnice liczbowo średnich mas molowych wyliczone teoretycznie i zmierzone za pomocą SEC. Skąd wynikają tak duże rozbieżności?

Zauważyłam, zapoznając się z pracą, że nie zostały wyjaśnione wszystkie skróty i symbole zastosowane w tabelach. Ponadto, w pracy występują sformułowania żargonowe, lub niewłaściwe w jęz. polskim, np. „wartości T_{CP} pozostawały w podobnym trendzie”, „chromatogramy dla kopolimerów”. Na określenie syntezy polimeru użyta została ‘reakcja’, co nie jest właściwe, gdyż polimeryzacja jest procesem, na który składa się wiele reakcji.

W podsumowaniu stwierdzam, że rezultaty badań objęte rozprawą wnoszą cenny wkład w wiedzę o polimerach o budowie gwiazdzistej zawierających ramiona polimerów o różnych właściwościach i stopniach polimeryzacji. Doktorantka wykazała duże umiejętności eksperymentatorskie w zakresie otrzymywania polimerów i kopolimerów liniowych i gwiazdzistych o kontrolowanych masach molowych i stosunkowo małych rozrzutach mas, w tym polimerów biodegradowalnych oraz znajomością metod analitycznych stosowanych do przeprowadzenia pełnych charakterystyk zsyntetyzowanych związków (np. ^1H NMR, FTIR-ATR, GPC, spektrofotometrii UV-Vis, spektroskopii korelacji fotonów, DSC, etc.).

Ponadto, praca doktorska p. mgr inż. M. Kupczak zawiera bogaty zbiór metod polimeryzacji wspomnianych materiałów, w tym, procedur kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej oraz kontrolowanej polimeryzacji anionowej z otwarciem pierścienia laktonowego np. ϵ -kaprolaktonu czy laktydu. W szczególności, do syntezy wybranych miktoramiennych kopolimerów, kontrolowane polimeryzacje rodnikowe i anionowe były prowadzone jednocześnie, w jednym naczyniu reakcyjnym. Dodatkowo, do przygotowania wieloramiennych polimerów gwiazdzistych zawierających ramiona biodegradowalne, Doktorantka zastosowała reagenty (prekursory) z grupami chemicznymi zdolnymi do utworzenia wiązań kowalencyjnych metodą *click chemistry*.

Ponadto, p. mgr inż. M. Kupczak jest współautorką 5 publikacji związanych z pracą oraz 3 innych publikacji, w czasopiśmie naukowym o zasięgu światowym, z współczynnikami oddziaływania w zakresie 3,483-5,364, w tym, w dwóch z nich jest pierwszym autorem. Poza tym, jest współautorką dwóch zgłoszeń patentowych i 24 wystąpień konferencyjnych, była ponadto, kierownikiem 4 projektów statutowych Politechniki Śląskiej oraz zajmowała się działalnością popularyzującą naukę i pełniła rolę opiekuna pomocniczego 3 prac badawczych. Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty ocenianej pracy, stwierdzam, że rozprawa doktorska pani mgr inż. Marii Kupczak spełnia kryteria stawiane kandydatom w Ustawie – Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (t.j. Dz. U. z 2020 r. poz.85 z późn. zm.). Z pełnym przekonaniem pozwalam sobie zaproponować Radzie Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej, aby na podstawie przedłożonej rozprawy, dopuścić panią magister inż. Marię Kupczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Łódź, 07.05.2023.