

Zabrze, 12 czerwca 2023 r.

Dr hab. inż. Agnieszka Kowalczyk, prof. CMPW PAN  
Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych  
Polskiej Akademii Nauk  
M. Curie-Skłodowskiej 34  
41-819 Zabrze

## RECENZJA

### **rozprawy doktorskiej mgr. Pawła Misiaka pt.: „Polimerowe nośniki leków na bazie N-izopropylakrylamidu zawierające ugrupowania steroidowe”**

#### **Podstawa przygotowania recenzji i informacje ogólne dot. pracy doktorskiej**

Niniejsza recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo prof. dr. hab. Joanny Karpińskiej, Dziekana Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku, z dnia 22 maja 2023 r., informujące o powołaniu mnie poprzez Radę Dyscypliny Nauki Chemiczne UwB na recenzenta rozprawy doktorskiej pana mgr. Pawła Misiaka.

Przedłożona do recenzji praca doktorska pana mgr. Pawła Misiaka pt.: „Polimerowe nośniki leków na bazie N-izopropylakrylamidu zawierające ugrupowania steroidowe” przygotowana została na Wydziale Chemii UwB, pod kierunkiem prof. dr. hab. Agnieszki Wilczewskiej. Rolę promotora pomocniczego pracy pełniła dr Karolina Markiewicz.

Rozprawa doktorska obejmuje badania nad otrzymaniem, funkcjonalizacją i właściwościami termowrażliwych (ko)polimerów na bazie N-izopropylakrylamidu oraz nad ich potencjalnym zastosowaniem do budowy nośników leków.

#### **Omówienie układu pracy i jej ocena formalna**

Obszerna rozprawa doktorska, licząca 186 stron, jest napisana w klasycznym układzie. Na początku pracy, po spisie treści i wykazie użytych skrótów, umieszczono wprowadzenie i część literaturową wraz z odpowiednim podsumowaniem (34 strony). Następnie, po przedstawionym celu pracy doktorskiej, można wyróżnić dwa główne rozdziały: część badawczą, zawierającą bardzo przydatny dla czytelnika atlas związków, rozbudowany opis uzyskanych wyników wraz z ich dyskusją, podsumowanie i wnioski końcowe (83 strony) oraz bardzo starannie opracowaną część eksperymentalną. Na końcu pracy znajdują się streszczenia pracy w języku polskim i angielskim, spisy rysunków, tabel i schematów, dorobek naukowy Doktoranta i bibliografia odnosząca się do 215 pozycji literaturowych.

We wprowadzeniu, Autor przedstawia problemy badawcze, stanowiące podstawę podjętej tematyki, wskazując na potrzebę poszukiwania nowych polimerowych nośników leków o ściśle zaplanowanych właściwościach. Trafnie uzasadnia potrzebę poszukiwania nowych rozwiązań syntetycznych do budowy nanonośników z polimerów czułych na zmiany temperatury środowiska. Wskazuje na rolę metod kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej umożliwiających uzyskanie makrocząsteczek o zaplanowanej masie molowej, a także na możliwości ich funkcjonalizacji mającej na celu wprowadzenie do ich struktury części „targetujących”, jak i ugrupowań zdolnych do kompleksowania cząsteczek leków.

Dwie kolejne części rozprawy: literaturowa i badawcza, zostały podzielone na rozdziały ze ściśle uporządkowaną treścią. Otrzymane przez Doktoranta wyniki badań zostały ujęte w sposób przejrzysty, z rozbudowaną dyskusją wykonanych licznych prac eksperymentalnych. Co ważne, obydwa rozdziały zawierają na końcu trafne podsumowania, w których ujęto najważniejsze wnioski.

Język rozprawy pod względem merytorycznym i stylistycznym jest dojrzały i poprawny. W pracy pojawiają się nieliczne błędy językowe, w tym np.: na str. 26 „*ilość grup funkcyjnych*” czy na str. 96 „*ilości ugrupowań cholesterylowych*”. Dla rzeczowników policzalnych, które wyrażają określone wielkości powinno z zasady stosować się słowo „liczba”. Na str. 13, w spisie stosowanych skrótów: *poli(2-dimetyloamino)etyloakrylan*) to niewłaściwie przetłumaczona z angielskiego nazwa odpowiedniego poliakrylanu. W pracy pojawiają się również literówki; np. na str. 15 „*poli(N-izopropyloakrylamid)*”, na str. 21 „*cachq*”, str. 22 „*Nanopartricles*” czy str. 59 „*poli(N-izoproyloakrylamidu)*”.

### **Omówienie istotności badań**

Temat podjętych przez Autora badań jest bardzo interesujący, zarówno pod względem poznawczym, jak i istotny ze względu na potencjalne użycie uzyskiwanych nanomateriałów polimerowych do kontrolowanego dostarczania i uwalniania substancji bioaktywnych. Podstawowym celem pracy pana mgr. Pawła Misiaka było takie zaprojektowanie struktur (ko)polimerowych na poziomie molekularnym, aby spełniały one wymagania stawiane polimerowym nośnikom leków.

W ostatnich dekadach otrzymywanie polimerów z użyciem nowoczesnych metod polimeryzacji kontrolowanych, jak i charakterystyka takich struktur, stało się popularnym przedmiotem badań. Wiele grup badawczych poddaje następnie otrzymywane makrocząsteczki różnym testom biologicznym, badając ich cytotoksyczność, aktywność hemolityczną, czy obrazując ich akumulację w komórkach. Bardzo często jednak zachowanie otrzymanych polimerów w roztworach, w tym w mediach stosowanych w testach biologicznych, jest kompletnie pomijane. Często nie wiadomo czy w roztworach używanych w takich badaniach znajdują się izolowane makrocząsteczki czy ich większe agregaty. Dodatkowo, obecność różnego rodzaju soli nieorganicznych i innych (bio)związków w pożywkach hodowlanych również może być dodatkowym czynnikiem wpływającym na zachowanie polimerów w takich mediach. W rezultacie, przy tylu zmiennych, wyciągnięcie jednoznacznych wniosków dotyczących potencjalnych zastosowań syntezowanych struktur jako nośników substancji bioaktywnych bywa niezwykle trudne.

Z powyższych powodów, na szczególną uwagę zasługuje zastosowane w pracy podejście badawcze mające na celu wykazanie, jak struktura chemiczna uzyskiwanych kopolimerów, a także możliwość kontrolowania ich organizacji w różnych roztworach wodnych, w tym pożywcze do hodowli komórek DMEM czy buforze PBS, a także w różnych warunkach temperaturowych, może ukierunkować ich przyszłe zastosowanie w biomedycynie. Wnikliwe badania Autora rozprawy, łączące wielokierunkową funkcjonalizację uzyskiwanych polimerów z niezbędną oceną struktur powstałych w roztworze, pozwoliły pokazać, jak wiele czynników może mieć wpływ na uzyskanie nietoksycznego nośnika o efektywnym działaniu.

Tematyka pracy doktorskiej wpisuje się doskonale w aktualne wyzwania badawcze związane z opracowaniem nowych materiałów o ściśle zaplanowanych właściwościach umożliwiających efektywne i kontrolowane uwalnianie leków do miejsca docelowego.

### **Omówienie i ocena zawartości merytorycznej**

Informacje zawarte w części literaturowej rozprawy zostały podzielone na trzy główne rozdziały. W pierwszym Autor przedstawił ogólny przegląd polimerowych nośników leków, możliwych syntetycznych metod ich otrzymywania, a także opisał pokrótce ich właściwości fizykochemiczne.

W rozdziale tym w mojej ocenie zabrakło jednak szerszego opisu możliwości potencjalnego zastosowania do budowy nośników polimerów o budowie rozgałęzionej – w tym szeroko stosowanych dendrymerów. Można się domyślać, że „ukrywają się” one gdzieś w stosunkowo krótkim rozdziale 1.1.4 pt. „Nanocząstki”. Niełatwo, na jednej stronie, opisać tak szeroką gamę nanomateriałów, a zbyt ogólny opis, mieszający polipleksy z nanocząstkami polimerowymi, nieorganicznymi i ich hybrydami w rezultacie niewiele wniósł do tematu rozprawy.

W kolejnym rozdziale Autor szczegółowo przedstawił możliwości syntetyczne mające na celu uzyskanie polimerowych nośników leków zawierających wbudowane cząsteczki cholesterolu. Dokładny przegląd polimerów z ugrupowaniem cholesterylowym na końcu łańcucha, jak i w łańcuchach bocznych został umieszczony w postaci tabel. Autor przedstawił również zalety i wady wykorzystania poszczególnych rozwiązań. Dość chaotycznie i w mojej ocenie zbyt ogólnie została przedstawiona na stronie 31, w rozdziale 2.1 „Polimery zawierające cholesterol na końcu łańcucha polimerowego”, istota polimeryzacji z odwracalnym addycyjno-fragmentacyjnym przeniesieniem łańcucha (RAFT), która jest główną techniką kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej stosowaną przez Doktoranta. Nie znajdziemy tam również szerszej informacji o polimeryzacji RAFT/MADIX. Uważam, że w aspekcie tego, że wszystkie rozdziały części badawczej bazują na tej technice, powinna zostać ona odpowiednio przedstawiona czytelnikowi. Część teoretyczną kończy rozdział poświęcony zjawisku termowrażliwości polimerów i wykorzystaniu do otrzymywania nośników leków najbardziej popularnego polimeru czułego na zmianę temperatury – poli(*N*-izopropylakrylamidu) (PNIPAAm).

Najważniejszą część rozprawy obejmującą badania własne Autora, podzielona jest na dwa główne rozdziały. Pierwszy z nich obejmuje wyniki dotyczące otrzymywania zarówno różnego typu związków niskocząsteczkowych (czynników przeniesienia łańcucha (CTA) i monomerów) jak i (ko)polimerów termoczułych oraz ich wszechstronną charakterystykę. Drugi rozdział dotyczy zaprojektowania na bazie uzyskanych makrocząsteczek nanocząstek oraz enkapsulacji w nich modelowej substancji bioaktywnej – doksorubicyny.

W swojej pracy Autor skupił się na optymalizacji warunków kontrolowanej polimeryzacji RAFT *N*-izopropylakrylamidu i komonomerów funkcyjnych z wykorzystaniem odpowiednio zmodyfikowanych CTA, co doprowadziło do otrzymania biblioteki czułych na zmiany temperatury makrocząsteczek o różnym rozłożeniu ugrupowań (bio)aktywnych. Pan mgr Paweł Misiak zajmował się syntezą homopolimerów *N*-izopropylakrylamidu i ich kopolimerów z *N*-winylokaprolaktamem, a także z odpowiednio funkcjonalizowanymi akrylanami. Otrzymane makrocząsteczki różniły się umiejscowieniem w ich strukturze cholesterolu - naturalnego lipidu o potencjalnej aktywności biologicznej. Wprowadzenie cholesterolu jako związku spełniającego rolę tzw. czynnika tropowego, do nośnika polimerowego miało za zadanie zwiększyć jego oddziaływanie z błonami komórkowymi, w tym np. komórek nowotworowych. Cholesterol został wprowadzony zarówno „na końcu” liniowych łańcuchów polimerowych, a także do poszczególnych merów poprzez wykorzystanie jako monomeru akrylanu cholesterylu. Otrzymane (ko)polimery modyfikowano otrzymując odpowiednie grup funkcyjne, np. tiolowe, co umożliwiło ich znakowanie fluoroforami. Dodatkowo podjęto próby wzbogacenia makrocząsteczek w bloki acetyloacetonowe i ketoestrowe zdolne do kompleksowania substancji bioaktywnych w celu wsparcia ich efektywnej enkapsulacji. Na wielkie uznanie zasługuje imponująca liczba wykonanych syntez i szczegółowa charakterystyka uzyskanych (ko)polimerów, przeprowadzona właściwie wszystkimi dostępnymi w fizykochemii polimerów metodami. Autor dokonał bardzo szczegółowych analiz, dostarczając szeregu bardzo wartościowych danych.

W ostatniej części pracy Autor podjął się zaprojektowania na bazie uzyskanych polimerów nanomateriałów o działaniu przeciwnowotworowym. Przedstawione wyniki obejmują otrzymywanie nanostruktur micelarnych, nanocząstek zagregowanych i ich wszechstronną charakterystykę w roztworach. Wyznaczono ich rozmiary, wartości potencjału zeta, zbadano termowrażliwość w roztworach wodnych oraz zbadano ich właściwości termiczne. Autor omówił w pracy również wyniki wielokierunkowych badań cytotoksyczności, hemokompatybilności nośników i enkapsulacji w nich doksorubicyny, które jasno wskazują na to, że uzyskane nośniki mają duży potencjał aplikacyjny w biologii i medycynie.

Warto podkreślić, że pomimo wielkiej liczby przeprowadzonych eksperymentów, wszystkie rezultaty zostały przedstawione w jasny dla czytelnika sposób, a wszystkie hipotezy przedstawione w celu rozprawy zostały poparte poprzez szczegółową charakterystykę uzyskanych wyników. Autor wykazał się bardzo dużą wiedzą, teoretyczną i praktyczną, co znalazło swoje odbicie w planowaniu badań i ich świetnej rea-

lizacji. Rezultaty przeprowadzonych prac ukazały się w czterech bardzo dobrych artykułach, których lista znajduje się w dołączonym do pracy dorobku Doktoranta. O nowatorstwie i innowacyjności świadczy również fakt dofinansowania prowadzonych badań z projektów Narodowego Centrum Nauki.

Podsumowując, w mojej ocenie przedstawiona rozprawa doktorska stanowi bardzo wartościowe osiągnięcie naukowe, zawierające istotne elementy nowości naukowej.

W wyniku analizy pracy, niezależnie od mojego uznania dla jej wysokiej wartości merytorycznej, chciałabym zwrócić uwagę na kilka nieprecyzyjnych fragmentów oraz na parę elementów dyskusyjnych.

Jak postuluje Autor na stronie 57 „*W wyniku polimeryzacji N–izopropylakrylamidu (...) uzyskano poli(N–izopropylakrylamidy) z ugrupowaniem cholesterylowym na końcu polimerowego łańcucha o zakładanej liczbie jednostek powtarzalnych (odpowiednio  $x = 18, 26, 48, 52, 72$  i  $95$ )*”. Na stronie 59 Doktorant podejmuje się jednak dyskusji nad (nie)zgodnością mas molowych wyznaczonych metodą chromatografii żelowej z wartościami teoretycznymi. Z dyskusji tej ciężko wyciągnąć jednoznaczne wnioski o kontroli nad prowadzonymi polimeryzacjami. Szczególnie niejasno zostało to ujęte dla polimerów Chol-PNIPAAm-X (7-9), gdzie pojawia się stwierdzenie: „*Analizy SEC wykazały, że średnie wartości  $M_n$  są zbliżone do siebie i różnią od wartości teoretycznych, gdy wzrastają masy cząsteczkowe polimerów – Chol-PNIPAAm-X (7-9)*.” Zasadnym byłoby ponowne przedyskutowanie przez Autora uzyskanych wyników, szczególnie w aspekcie danych umieszczonych w Tabeli nr 4. Wyznaczona masa molowa polimeru – Chol-PNIPAAm-X (7) różni się od Chol-PNIPAAm-X (9) prawie dwukrotnie.

Do syntez kopolimerów NIPAAm z N-winylokaprolaktamem Autor wytypował polimer Chol-PNIPAAm-X (9) o masie molowej 10 940 g/mol, licząc na to, że wbudowanie od dwóch do ośmiu merów tego komonomeru powinno podwyższyć temperaturę przejścia. Dlaczego zdecydowano się na dodanie tak znikomej liczby merów? Przedstawiona w Tabeli 5 masa molowa kopolimeru, który powinien zawierać dwa mery N-winylokaprolaktamu, wyznaczona metodą chromatografii żelowej jest niższa od wyjściowego bloku Chol-PNIPAAm-X (9). Czy w ocenie doktoranta chromatografia żelowa jest tu adekwatną metodą do oceny przyłączenia 2 merów? Wydaje się, że pomiary te są obciążone dość znacznym błędem pomiarowym.

Doktorant zsyntezował również modelowy PNIPAAm metodą klasycznej polimeryzacji rodnikowej (str. 57). Poza wyznaczeniem wartości  $T_{cp}$  w wodzie, nie scharakteryzował jednak tego polimeru (Tab. 4). Co miała na celu taka synteza skoro polimeru nie można porównać z resztą uzyskanych makrocząsteczek?

Większość uzyskanych kopolimerów charakteryzuje się temperaturą przejścia fazowego w mediach stosowanych w testach biologicznych (DMEM czy PBS) niższą od 37°C. Polimery, które mają dostarczać leki powinny być co do zasady rozpuszczalne w wodzie. Czy fakt agregacji polimeru spowodowanej przejściem fazowym, nie miał wpływu na uzyskane wyniki testów biologicznych, skoro są one przeprowadzane w 37°C?

Czy w ocenie Doktoranta, suszenie uzyskanych produktów polimeryzacji w piecu w 60°C może skutkować utratą rozpuszczalności i agregacją łańcuchów? Dla innych polimerów termowrażliwych - poli(metakrylanów glikolu oligoetylenowego) często obserwuje się, że sposób osuszania polimeru poprzez liofilizację lub usuwanie rozpuszczalnika w temp. pokojowej ma znaczący wpływ na ich rozpuszczalność.

W części literaturowej i w dyskusji wyników w wielu przedstawionych przykładach brakuje szczegółów dotyczących składu chemicznego opisywanych polimerów. Na przykład na stronie 27 „Z drugiej strony pozytywny efekt wywiera zmiana architektury nośnika z liniowej na dendrymerową, co podnosi zarówno wartości LE, jak i LC.[83]”, na str. 30 „Ostatnie badania pokazują, że nawet przy stosunkowo dużym balastie polimerowym możliwe jest wykorzystanie właściwości cholesterolu obecnego na końcu łańcucha polimerowego [97]”. O badanych polimerach nic więcej nie wiadomo. W pracy pojawiają się również uogólnienia i skróty myślowe: str. 31 „metoda RAFT ma największą tolerancję na reaktywne grupy funkcyjne”, str. 32 „Ilość CTA w nośniku zależy od długości łańcucha polimerowego”, czy str.40 „Cholesterol stymuluje wychwyty komórkowy w sposób zależny od raftera lipidowego [147]”. Czytelnik może się domyślać o co chodzi, ale powinno to zostać w rozprawie wyjaśnione, aby nie wprowadzać go w błąd.

#### **Wnioski końcowe**

Niezależnie od przedstawionych uwag, stwierdzam że rozprawa doktorska pana mgr. Pawła Misiaka obejmuje bardzo istotne zagadnienia badawcze z zakresu nowoczesnych materiałów polimerowych o wysokim potencjale aplikacyjnym. Za duże osiągnięcie badawcze należy uznać wykorzystanie procesu RAFT/MADIX do syntez polimerów, które w swojej budowie zawierają cząsteczki tropowe oddziałujące z błonami komórek. Założone cele badawcze pracy zostały w pełni zrealizowane. Rozprawa stanowi duży wkład do stanu wiedzy na temat praktycznego wykorzystania funkcjonalizowanych polimerów termowrażliwych do budowy nośników leków. Chciałabym również podkreślić wyróżniający dorobek naukowy Doktoranta, który jest współautorem 11 publikacji w bardzo dobrych czasopismach recenzowanych, w pięciu z tych prac jest pierwszym autorem i w jednej autorem korespondencyjnym. Jest również kierownikiem grantu PRELUDIUM 19, 2020/37/N/ST5/02140 „Termowrażliwe polimery gwiazdowe oparte na steroidach i sacharydach jako nowoczesne systemy dostarczania leków” finansowanego ze środków NCN. Taki dorobek naukowy bez wątpliwości potwierdza dojrzałość naukową Autora.

Stwierdzam, że przedstawiona praca spełnia formalne wymagania stawiane przewodnikom doktorskim i warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) w odniesieniu do rozpraw doktorskich.

W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemicznej Uniwersytetu w Białymstoku o dopuszczenie pana mgr Pawła Misiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Agnieszka Kowalczyk*