

**Prof. dr hab. inż. Zofia Mazerska**

Katedra Technologii Leków i Biochemii  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Gdańska  
ul. Narutowicza 11/12  
80-233 Gdańsk  
☎ : (058) 347 24 07  
e-mail: zofia.mazerska@pg.gda.pl



---

Gdańsk, dnia 20.11.2016

Ocena rozprawy doktorskiej

**mgr inż. Marcina Maćkiewicza**

pt. *„Środowiskowo-czułe mikrozele na bazie N-izopropylakrylamidu.  
Synteza, właściwości i zastosowanie.“*

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej Autor skupił się na syntezie i analizie właściwości nowych struktur mikrozeleli tzw. inteligentnych polimerów, które mogą ulegać objętościowemu przejściu fazowemu i występować w stanach spęczniałym i skurczonym w odpowiedzi na zmiany m.in. temperatury, pH, siły jonowej, ciśnienia, składu rozpuszczalnika czy promieniowania elektromagnetycznego. Mając zdolność szybkiej odpowiedzi na czynniki zewnętrzne oraz możliwość magazynowania (wiązań) cząsteczek w strukturze mikrozeleli są one przedmiotem zainteresowania wielu grup badawczych w aspekcie m.in. sensorów, specyficznych katalizatorów oraz potencjalnych nośników leków.

Praca zrealizowana została na Wydziale Chemii UW w Pracowni Teorii i Zastosowań Elektrood w zespole naukowym kierowanym przez Pana prof. dr hab. Zbigniewa Stojka. Zespół od szeregu lat prowadzi badania przemian elektrochemicznych związków biologicznie czynnych, m.in. leków przeciwnowotworowych, zarówno w postaci wolnej jak i w postaci związanej z DNA oraz z nanocząsteczkami magnetycznymi na bazie tlenków żelaza. W ostatnich latach w kręgu zainteresowań zespołu znalazły się również elektrody modyfikowane polimerami i żelami wrażliwymi na parametry zewnętrzne, takie jak temperatura, siła jonowa, stężenie wybranych jonów itp. Odpowiednio zaprojektowane, mogą one znaleźć zastosowanie przy konstrukcji czujników wrażliwych na zmiany warunków środowiska, w którym zostaną umieszczone. Tym samym recenzowana rozprawa doktorska Pana mgr Maćkiewicza ma charakter badań podstawowych dotyczących rozpoznania możliwości zaprojektowania i zsyntetyzowania mikrozeleli na bazie N-izopropylakrylamidu (NIPA) wrażliwych na zmiany z góry założonych czynników fizycznych, fizykochemicznych lub chemicznych. Praca zawiera również elementy aplikacyjne.

Celem recenzowanej pracy była synteza i możliwie szeroki opis właściwości nowych polimerycznych mikrozeleli opartych na strukturze w/w monomeru NIPA. Nowe struktury powstały poprzez wprowadzenie do sieci polimerycznego żelu pNIPA trzech typów związków (grup funkcyjnych): (i) aminokwasów, w tym ornityny oraz cystyny (ii) polimeru przewodzącego, polianiliny (PANI) oraz, na

otrzymane przez Doktranta. Po drugie, w r-niu 36 na str. 93 nawiasy kątowe oznaczają „uśrednienie po czasie” a nie „średni czas”.

Rozdział 8, pt. „Synteza mikrożeli” najbardziej odpowiada zawartości *Części eksperymentalnej*. Zostały w nim jasno opisane i bardzo obrazowo zilustrowane procedury syntezy mikrożeli nieusieciowanych, pNIPA i usieciowanych p(NIPA-BIS) oraz mikrokompozytu p(NIPA-BIS)/PANI, gdzie BIS oznacza N,N'-metylenobisakryloamid, a PANI – polimer anilinowy. W podobny sposób na bazie polimeru NIPA zsyntetyzowany został polimer p(NIPA-BIS-AcOrn) zawierający dodatkowo jako czynnik sieciujący monomer N- $\delta$ -akryloilornityny, z jego różnym udziałem procentowym. N-izopropylakryloamid został też usieciowany związkiem zawierającym mostek disiarczkowy: N,N'-bis(akryloilocystyną) (BISS) dając polimery o symbolu p(NIPA-BISSy%) o różnej zawartości pochodnej cystyny. Opis procedury umieszczenia doksorubicyny w sieci mikrożelu został umieszczony w rozdziale 11. W opisie powyższych procedur syntez polimerów mikrożeli zabrakło danych o wydajności tych przemian.

Kolejny, rozdział 9 *Części eksperymentalnej* zawiera opis właściwości zsyntetyzowanego polimerowego mikrożelu usieciowanego ornityną: p(NIPA-BIS-AcOrn). Wprowadzenie cząsteczki zawierającej jednocześnie grupę karboksylową oraz aminową poszerzyło znacznie właściwości polimeru nadając mu wrażliwość na zmiany pH oraz na obecność niektórych jonów zdolnych do tworzenia kompleksów z siecią polimerową. Badania wpływu zawartości N- $\delta$ -akryloilornityny na stan napęcznienia żelu ujawniły przy okazji, że procentowy udział tego związku w sieci polimerowej jest istotnie niższy niż był w mieszaninie monomerów przygotowanej do reakcji. Prawdopodobnie dotyczy to również udziału innych związków wprowadzonych do sieci pNIPA. Bardzo szeroko Doktorant przedyskutował wpływ pH na stan napęcznienia mikrożeli (mierzony średnicą hydrodynamiczną cząsteczek). Istotną wrażliwość wykazały dopiero polimery z 13% zawartością AcOrn i jest ona zgodna ze zdolnością do przechodzenia aminokwasu z formy kationu do formy obojętnej i dalej do formy anionowej. Analiza tych zależności jest istotna, między innymi dlatego, że postać jonu obojętnego aminokwasu uaktywnia oddziaływania hydrofobowe oraz van der Waals'a, które indukują kurczenie mikrożelu. Natomiast jednoimienne ładunki w sieci polimerowej powodują wzrost ciśnienia osmotycznego oraz generują siły odpychania elektrostatycznego pomiędzy łańcuchami, co w sumie prowadzi do pęcznienia sieci polimerowej. W konsekwencji, znajomość tych warunków pomiędzy pęcznieniem a kurczeniem polimeru daje możliwość zaprojektowania jego właściwości pod kątem zastosowań praktycznych. W pracy wykazano także, że wprowadzenie jonu  $\text{Cu}^{+2}$  spowodowało spadek stopnia spęcznienia oraz obniżenie temperatury przejścia fazowego. Jest to ważny wynik, gdyż wskazał, że siłę wiązania metali ciężkich można kontrolować zmianą pH i temperatury. Jednak nie obserwowano takich zmian w obecności jonów wapnia. Słuszność przedstawionej w pracy interpretacji tego wyniku potwierdziłyby dopiero przykłady innych jonów metali dwuwartościowych.

Celem otrzymania mikrokompozytu NIPA z polianiliną p(NIPA-BIS)/PANI było podobnie jak w przypadku p(NIPA-BIS-AcOrn) określenie wpływu polianiliny na strukturę, stopień spęcznienia i przejścia fazowego, ale również nadanie jemu cech przewodności i elektroaktywności. Badania transmisyjnej (TEM) i skaningowej (SEM) mikroskopii elektronowej (rozdział 10) wskazały, że

polianilina tworzy na powierzchni cząstek mikrożelu nanowłókna dość równomiernie rozmieszczone w całej objętości. Temperatury przejścia fazowego usieciowanego mikrożelu p(NIPA-BIS) i usieciowanego kompozytu były zbliżone, ok. 33°C, co wskazuje, że PANI oddziałuje tylko fizykochemicznie z siecią p(NIPA-BIS). Rozkład średnicy hydrodynamicznej cząsteczek p(NIPA-BIS) i p(NIPA-BIS)/PANI w stanie spęczniałym, 25°C i w skurczonym, 40°C różnił się nieco, ale nie przeprowadzono analizy statystycznej istotności różnic otrzymanych wyników i trudno te różnice ocenić. Zadany cel został zrealizowany, bo przewodność właściwa mikrokompozytu NIPA z aniliną wzrosła ok. 10 razy, a na woltamperogramach roztworów p(NIPA-BIS)/PANI otrzymano dwie pary pików układów redoks, przy czym wysokość pików była najwyższa dla stanu skurczonego. Zgadza się z interpretacją tych wyników i z sugestią Autora, że opisane właściwości stanowią potencjał dla projektowania nowych systemów analizy elektrochemicznej, w tym sensorów.

Istotną właściwość nanocząstek, których zadaniem jest transport leku do organizmu stanowi zdolność do selektywnego uwolnienia leku w zadanych warunkach w organizmie. W przypadku mikrożeli p(NIPA-BISS) zostało to zaprojektowane poprzez obecność w strukturze mikrożelu mostków disiarczkowych (BISS), które mogą być zdegradowane, i w ten sposób lek zostanie uwolniony ze struktury polimeru. W pracy słusznie, jako czynnik degradujący zastosowano obok związku modelowego ditiotritolu, DTT, tripeptyd glutation, GSH. Jednak dane, uzasadniające tą decyzję, o różnicy zawartości GSH cytoplazmie i przestrzeniach międzykomórkowych oraz w komórkach zdrowych i nowotworowych są nieco bardziej skomplikowane niż przedstawiono. Wyniki eksperymentu wskazały, że mikrożel o 1% zawartości BISS ulegał degradacji, natomiast 3% zawartość BISS powodowała zahamowanie rozpadu wiązań S-S pod wpływem tioli. Próba interpretacji tego wyniku skierowała autora na możliwość powstawania tioeterów podczas syntezy mikrożelu, ale nie da się także wykluczyć, że w mikrożel p(NIPA-BISS3%) w formie spęczniałej (10°C) słabiej „dopuszcza” GSH do usieciowanej struktury.

Przeprowadzono badania, w których Doksorubicyna została umieszczona w mikrożelu podczas 24-godzinnej inkubacji w temp. 37 stopni, schłodzona do 25 °C, a następnie uwalniana przy 37°C. Dlaczego zastosowano 37°C, czyli wprowadzano lek do formy niespęcznianej mikrożelu, a potem roztwór schłodzono? Z uznaniem natomiast odebrałam koncepcję selektywnego uwalniania leku do komórek nowotworowych o pH niższym niż w środowisku tkanki zdrowej, opartej na sile wiązania grupy karboksylowej z „siecią mikrożelu” z grupą aminową doksorubicyny. Otrzymany wynik potwierdził to założenie. Moim zdaniem jest to najciekawszy element pracy. Myślę, że w dalszych badaniach można pomyśleć o dłuższym czasie uwalnianiu leku, a wówczas cytotoxycywność formy DOX skompleksowanej z mikrożelem powinna być wyższa niż formy niezwiązanej.

Tekst rozprawy jest napisany jasnym, precyzyjnym językiem, przystępnie przekazującym myśli Autora, chociaż jak wspominałam powyżej, *Część literaturowa* zawiera kilka powtarzających się elementów. Strona edytorska pracy, poza przedstawionymi powyżej uwagami, co do jej układu, jest wyjątkowo staranna, zarówno w obrębie tekstu jak i części graficznej. Nie znalazłam też wielu usterek językowych ani zwrotów żargonowych, jedynie kilka potknięć. Np. stosowałabym zwrot polimery „wrażliwe” na warunki środowiska, a nie „czułe” na warunki środowiska, „stosowana” metoda, a nie „używana” metoda, temperatura „obniża się”, a nie „zmniejsza się”.

Podsumowując, recenzowana praca doktorska prezentuje wysoki poziom przeprowadzonych badań. Wskazuje na kompetencje Doktoranta w zakresie fizykochemii i stosowanych w tej dziedzinie najnowszych technik eksperymentalnych, jak i na otwartość w kierunku wiedzy o funkcjonowaniu organizmów żywych, co dało efekt w koncepcji trzeciej części pracy, który oceniam bardzo wysoko. Wyniki każdej części recenzowanej pracy zostały opisane w trzech publikacjach, gdzie Doktorant jest pierwszym autorem, jest On także współautorem innych trzech publikacji.

Stawiam wniosek, że rozprawa Pana mgr Marcina Mackiewicza pt. „Środowiskowo-czułe mikrozele na bazie N-izopropylakrylamidu. Synteza, właściwości i zastosowanie” spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym i przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego wniosek o dopuszczenie Pana mgr Marcina Maćkiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

