



**UMCS**  
UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ  
W LUBLINIE

21.05. 2021

prof. dr hab. Barbara Gawdzik  
Katedra Chemii Polimerów  
ul. Gliniana 33, 20-614 Lublin,  
barbara.gawdzik@umcs.pl

## **RECENZJA**

**osiągnięć naukowych w postępowaniu habilitacyjnym pt.**

**„Mikro- i nano-cząstki polilaktydowe, jako potencjalne nośniki leków**

**w terapiach przeciwnowotworowych”**

**dr inż. Marka BRZEZIŃSKIEGO**

Recenzja została opracowana na podstawie pisma Prof. dr hab. Henryka Kozłowskiego – Przewodniczącego Rady Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, powołującego mnie Uchwałą w/w Rady z dnia 15 marca 2021 r. na recenzenta komisji habilitacyjnej w celu przeprowadzenia postępowania habilitacyjnego dr. inż. Marka Brzezińskiego.

W recenzji przyjmam kryteria wynikające z Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. , poz. 1789), Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. z 2018 r., poz. 261), Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668).

Recenzja obejmuje ocenę dorobku naukowego dr inż. Marka Brzezińskiego ze szczególnym uwzględnieniem osiągnięcia naukowego pt. „Mikro- i nano-cząstki polilaktydowe, jako potencjalne nośniki leków w terapiach przeciwnowotworowych”. Została sporządzona na podstawie materiałów przygotowanych przez Kandydata.

## I. Dane ogólne o Kandydacie

Dr inż. Marek Brzeziński pracuje na stanowisku adiunkta w Dziale Polimerów Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk (CBMiM) w Zespole Polimerów Reaktywnych i Supramolekularnych. W 2008 r. uzyskał tytuł magistra inżyniera chemii na Wydziale Chemii Politechniki Łódzkiej. W grudniu 2009 r. został zatrudniony w Zakładzie Chemii Polimerów Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk, początkowo na stanowisku pracy - chemik a od października 2011 r. na stanowisku asystenta. W 2014 r. uzyskał stopień doktora nauk chemicznych na podstawie pracy pt.: „Modyfikowane polilaktydy zdolne do samoorganizacji. Synteza i właściwości”, której promotorem był dr hab. Tadeusz Biela, prof. CBMiM. W czerwcu 2015 r. wyjechał na staż podoktorski na Wolny Uniwersytet w Berlinie w ramach stypendium Humboldta, gdzie pracował w grupie profesorów prof. Sebastiana Seifferta i Marcelo Calderóna. Po powrocie do kraju, w lipcu 2017 r. został zatrudniony na stanowisku adiunkta w Zespole Polimerów Reaktywnych i Supramolekularnych CBMiM, a którym pracuje do dziś.

## II. Ocena osiągnięć naukowych, stanowiących znaczny wkład w rozwój dyscypliny

W skład dorobku naukowego dr inż. Marka Brzezińskiego wchodzi 28 artykułów naukowych, opublikowanych w czasopismach z IF, rozdział w *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*, 37 prezentacji na konferencjach krajowych i zagranicznych, w tym wykład sekcyjny na Zjeździe Naukowym PTChem w Krakowie w 2018 r.

Sumaryczny *Impact Factor* (IF) prac, stanowiących dorobek publikacyjny Kandydata, wynosi 113,82. Liczba cytowań, według bazy Web of Science, wynosi 392 a indeks Hirscha  $h = 10$ .

Warty podkreślenia jest fakt, że wszystkie artykuły naukowe Kandydata zostały opublikowane w renomowanych czasopismach z dziedziny polimerów. Pomijając artykuł opublikowany w *Polimerach* (IF = 0.802), IF pozostałych czasopism mieści się w zakresie od 2.075 dla *Curr. Org. Chem.* do 24.521 dla *Prog. Polym. Sci.* Dr inż. Marek Brzeziński był głównym wykonawcą w projekcie NCN, OPUS (DEC-2013/09/B/ST5/03616) pt.: „Supramolekularne struktury liniowych i gwiaździstych polilaktydów oraz ich stereokompleksy poprzez oddziaływania funkcjonalizowanych grup końcowych („lepkich końców”). Synteza i relacje między strukturą i właściwościami”, realizowanym w CBMiM. Temat dotyczący supramolekularnych sieci polilaktydowych realizował podczas 2-letniego stażu podoktorskiego w latach 2015-2017 w Wolnym Uniwersytecie w Berlinie (stypendium Humboldta, POL 1159727 STP). Po powrocie do kraju uzyskał finansowanie projektu pt.: „Inteligentne nanocząstki na bazie kopolimerów

i stereokompleksów polilaktudu jako potencjalne nośniki związków biologicznie aktywnych” w ramach konkursu NCN, SONATA 12 (DEC-2016/23/D/ST5/02458). W tym projekcie pełnił rolę kierownika.

### III. Ocena osiągnięcia naukowego

Z publikacyjnego dorobku podoktorskiego, dr inż. Marek Brzeziński wyodrębnił 8 artykułów, które stanowią podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego. Zbiór tych artykułów (oznaczonych w materiałach jako poz. H-1-H-8 Autorefetatu) nosi wspólny tytuł „Mikro- i nano-cząstki polilaktydowe, jako potencjalne nośniki leków w terapiach przeciwnowotworowych”. Artykuły zostały opublikowane w latach 2015-2019 a ich sumaryczny IF wynosi 25,575. Współczynnik wpływu (IF) w przeliczeniu na jeden artykuł, wynosi 2,841. Wśród wymienionych prac, jedna jest samodzielna, a w pozostałych dr inż. Brzeziński jest pierwszym lub korespondencyjnym autorem. Artykuły oznaczone jako H-7 i H-8 mają charakter prac przeglądowych, pozostałe to oryginalne publikacje naukowe.

Przedstawiony do oceny cykl powiązanych tematycznie opublikowanych artykułów naukowych dotyczy metod otrzymywania mikro- i nano-cząstek polilaktydowych i prób ich zastosowania w charakterze nośników substancji biologicznie aktywnych, ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania w terapii antynowotworowej.

Polilaktyd (PLA) jest interesującym polimerem, który ze względu na biogodność i biodegradowalność, jest często proponowany jako nośnik leków. Jego makrocząsteczki mogą tworzyć stereokompleksy między dwoma enancjimerycznymi izomerami: poli(L-laktydem) (PLLA) i poli(D-laktydem) (PDLA), w efekcie tworzenia wiązań wodorowych. To właśnie tę cechę Kandydat wykorzystał do otrzymywania stereokompleksowych mikrosfer. W pracy H-1 Kandydat przedstawił sposób otrzymywania jednorodnych mikrosfer metodą mikroprzepływów w kapilarach szklanych. Roztwory polilaktydów PLLA i PDLA sfunkcjonalizowane grupami ureido-[2]-pirydynowymi (UPy) na jednym lub obu końcach łańcucha wraz z rozpuszczonym lekiem zastosował jako fazę rozproszoną a wodny roztwór PVA jako fazę ciągłą w metodzie mikroprzepływów. Po odparowaniu rozpuszczalnika, otrzymał mikrosfery o średnicach 40 i 60  $\mu\text{m}$ . Metodą FTIR potwierdził wytworzenie struktury stereokompleksowej, w oparciu o zmiany konformacji  $\alpha$  helisy, charakterystycznej dla emancjomerów PLA, na helisę  $\beta$  występującą w stereokompleksach (zanik pasma przy  $921\text{ cm}^{-1}$  i pojawienie się pasma przy  $909\text{ cm}^{-1}$ ). Mikrosfery poddał badaniom czułości na zmiany pH. Przeprowadził uwalnianie modelowego związku ((S)-(+)-4-(3-amino-pirrolidyno)-7-nitrobenzofurazanu (NBD) w środowisku kwasowym (pH=5), charakterystycznym dla komórek rakowych i w pH=7, typowym dla zdrowych

komórek. Sukces okazał się połowiczny, bo wprawdzie otrzymane cząstki, uwalniały więcej modelowego związku w kwasowym pH ale całościowy procent uwalnianego leku był niewielki.

Metodę mikroprzepływów wykorzystał także otrzymywanie mikrokapsuł z supramolekularnych PLA, umożliwiającej wytwarzanie kropeł podwójnej emulsji (woda/faza organiczna/woda). Do fazy organicznej dodał czerwień Nilu jako modelowy lek. Wyniki badań przedstawił w pracy H-2. Stwierdził, że stabilne krople powstają jedynie w przypadku, gdy możliwe jest wytworzenie oddziaływań między enancjomerycznymi łańcuchami PLLA i PDLA. Natomiast krople emulsji otrzymane z zastosowaniem tylko jednego z enancjomerów były niestabilne, ulegały kurczeniu i ostatecznie rozpadowi. Dla kropeł podwójnej emulsji zbudowanych z makrocząsteczek wzmocnionych stereokompleksowaniem pomiędzy enancjomerycznymi łańcuchami UPy-PLLA-OH i UPy-PDLA-OH, zaobserwował tworzenie mikrokapsuł pustych w środku. Średnica tych mikrokapsuł to około 160  $\mu\text{m}$  a średnica stereokompleksowej powłoki wynosiła około 5  $\mu\text{m}$ . Otrzymane mikrokapsuły poddał stresowi osmotycznemu, poprzez dodatek silnie zasadowego i silnie kwasowego roztworu. Zaobserwował, że w środowisku zasadowym mikrokapsuły najpierw pęczniały a potem kurczyły się do wielkości około 84  $\mu\text{m}$ , co powodowało zdeorganizowanie powłoki stereokompleksowej i uwalnianie czerwieni Nilu. Natomiast w środowisku kwasowym nie zaobserwował zmian średnic mikrokapsuł ani uwalniania modelowego leku. Kandydat postuluje wykorzystanie tego typu mikrokapsuł, czułych na zmiany pH, do dostarczania leków do dwunastnicy, w której silnie zasadowe pH, umożliwi uwalnianie leku na skutek rozrywania wiązań wodorowych między grupami UPy, wbudowanymi w każdy łańcuch PLA. Uważam te wyniki za obiecujące. Z pewnością stanowią krok do przodu w dziedzinie syntezy nośników leków o docelowym działaniu.

W pracy H-3 Kandydat przedstawił wyniki prac nad otrzymywaniem metalo-supramolekularnych nano- i mikrocząstek. Do tego celu wykorzystał wcześniej otrzymane PLA sfunkcjonalizowane terpirydyną (TPy). Po przeprowadzeniu reakcji sprzęgania za pomocą diizocyjanianu heksametylenowego, otrzymał PLA z grupami TPy na obu końcach łańcucha polimerowego (BisTPy-PLA), tj. ugrupowaniami tworzącymi kompleksy z większością jonów metali przejściowych. W oparciu o metodę mikroprzepływów otrzymał mikrosfery, zdolne do kompleksowania metali. PLA wraz z modelowym lekiem był tu fazą rozproszoną a fazą ciągłą stanowił wodny roztwór polialkoholu winylowego z jonami  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$ . Średnica otrzymanych mikrosfer mieściła się w zakresie 40-60  $\mu\text{m}$  i wyraźnie zależała od rodzaju kompleksowanego jonu metalu oraz od stereokompleksowania pomiędzy makrocząsteczkami PLLA i PDLA. Najmniejsze średnice i rozrzut wielkości cząstek uzyskał, gdy jako jon zastosował  $\text{Fe}^{2+}$ . Metalo-supramolekularne PLA po stereokompleksowaniu posiadały strukturę porowatą. Aby ocenić jaki wpływ na kinetykę uwalniania leków ma morfologia mikrosfer, Kandydat przeprowadził badania uwalniania, wcześniej stosowanego,

modelowego leku (NBD). Z badań wynikało, że procent początkowego uwalniania leku jest większy dla porowatych, stereoskompleksowanych mikrosfer w porównaniu do mikrosfer o jednorodnej, gładkiej powierzchni. Kandydat doszedł do przekonania, że takie mikrosfery mogą być wykorzystane w walce z infekcjami, gdzie wymagana jest długoterminowa terapia i wolne uwalnianie leku.

Badania dotyczące uwalniania leków przeciwnowotworowych, Kandydat przedstawił w pracach H-4, H-5 i H-6. Nanocząstki z supramolekularnych polilaktydów, czułe na zmiany temperatury i pH, otrzymał stosując metodę nanowytrącania (H-4). Wykorzystał polilaktydy sfunkcjonalizowane UPy na jednym lub na obu końcach łańcucha do uwalniania leku przeciwnowotworowego DOX. Potwierdził ich stabilność w medium komórkowym oraz w buforach o pH, charakterystycznym dla ciała ludzkiego oraz kwasowym, charakterystycznym dla zmian nowotworowych. Wykazał, że uwalnianie DOX zachodzi znacznie szybciej w kwasowym środowisku oraz w temperaturze 37 °C w porównaniu do 25 °C. Dalsze bardziej zaawansowane badania, miały na celu zbadanie cytotoksyczności otrzymanych nanocząstek. Do tych badań, Kandydat wykorzystał komórki raka szyjki macicy (HeLa) oraz komórki rakowe KB-VI, z wykształconą opornością na leki. Wykresy przeżywalności komórek rakowych po inkubacji z nanocząstkami załadowanymi DOX, pozwoliły na wyciągnięcie wniosku, że takie cząstki są w stanie zwalczać komórki rakowe, zwłaszcza w przypadku KB-VI. Zdaniem Kandydata, po dostarczeniu DOX do wnętrza komórek rakowych KB-VI, nanocząstki uwalniają lek na skutek degradacji matrycy polilaktydowej i wrażliwości grup UPy na kwasowe pH.

W pracy H-5 przedstawił wyniki badań dotyczące stereokompleksowania miceli zbudowanych z polilaktydów z rdzeniem cyklodekstrynowym. W tym celu otrzymał enencjomeryczne, gwiaździste PLLA i PDLA, których rdzenie stanowiły metylowana  $\beta$ -cyklodekstryna ( $M\beta CD$ ), zdolna do tworzenia oddziaływań gość-gospodarz i dipentaerytrytol (DPE), niezdolny do supramolekularnych oddziaływań. Micele napełnione DOX, o wielkości 100-175 nm, otrzymał metodą nanowytrącania. W tych cząstkach do kontrolowania szybkości uwalniania DOX wykorzystał supramolekularne oddziaływania typu gość-gospodarz. Podobnie, jak w poprzedniej pracy, zbadał cytotoksyczność otrzymanych micel. Tym razem oprócz komórek HeLa użył komórek przewlekłej białaczki szpiku kostnego (K562). Najbardziej efektywne w redukcji komórek rakowych okazały się micidele stereokompleksowane, uwalniające DOX w dłuższym czasie. Kandydat ustalił także lokalizację stereokompleksowych micel w komórce. Zdjęcia z mikroskopu optycznego pozwoliły na zaobserwowanie wolnej DOX jak i uwalniającej się z otrzymanych micel w jądrach komórkowych, co oznacza że DOX po uwolnieniu z micel wiąże się z genomowym DNA. Są to niewątpliwie przełomowe wyniki. Jestem pełna uznania dla Autorów tej publikacji.

W pracy H-6, Kandydat wykorzystał metodę spontanicznego wytrącania mikrocząstek stereokompleksowych zbudowanych z polilaktydów sfunkcjonalizowanych Boc-L-proliną i L-proliną.

Cząstki o średnicach 0,5 -10  $\mu\text{m}$ , wytrącone z THF, DIOX lub ich mieszanin, po napełnieniu DOX zaproponował do użycia w dostarczaniu leku metodą inhalacji. W temperaturze 37°C zbadał uwalnianie DOX. Wolno przebiegające uwalnianie (5-10% po 100 godz.) zaobserwował dla mikrosfer zbudowanych z PLLA i PDLA sfunkcjonalizowanych Boc-L-proliną, natomiast dla mikrosfer sfunkcjonalizowanych L-proliną mieściło się w przedziale 41-81% po 100 godz. Istotną obserwacją było to, że szybkość uwalniania DOX korelowała z redukcją przeżywalności komórek raka płuc - A459. Najlepsze wyniki uzyskał dla mikrosfer otrzymanych z PLLA i PDLA sfunkcjonalizowanych L-proliną, otrzymanych z THF. Aby zbadać przebieg wnikania mikrocząstek do komórek raka płuc, wykonał zdjęcia przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Dzięki tej metodzie mógł zaobserwować, że mikrocząstki o średnicach 5-10  $\mu\text{m}$  (Boc-L-prolina PLLA/PDLA), natomiast mniejsze cząstki o średnicach w zakresie 0,5-3  $\mu\text{m}$  (L-prolina PLLA/PDLA) wnikają do komórek i uwalniają DOX w cytoplazmie. Mikrocząstki te mogą zatem służyć jako rezerwuar DOX, który uwalnia się w komórkach raka płuc, prowadząc do ich obumierania. W efekcie, dr inż. Brzeziński otrzymał skuteczny sposób na dostarczanie leku antynowotworowego dokładnie w miejsce występowania zmian nowotworowych. Wartość tej pracy dodatkowo podnosi fakt, że po raz pierwszy zastosował metodę spontanicznego wytrącania stereokompleksowych mikrosfer, obsadzonych DOX.

Ważkie osiągnięcia naukowe Kandydata podsumowują 2 artykuły przeglądowe, opublikowane w *Polym. Int.*, oznaczone jako H-7 i H-8. W tych dwu- i trójautorskich pracach, przedstawił syntezę nano- i mikro-cząstek polilaktydowych za pomocą techniki mikroprzepływów oraz możliwości ich wykorzystania, zwłaszcza jako systemy dostarczania leków. Szczególną uwagę zwrócił na projektowanie takich nośników leków antynowotworowych, które mogą je uwalniać w sposób kontrolowany.

Podsumowując, należy stwierdzić, że cykl artykułów opublikowanych przez Kandydata jest powiązany tematycznie. Zaprezentowana problematyka jest nie tylko aktualna ale także perspektywiczna. Dr inż. Marek Brzeziński jest niewątpliwie uznanym specjalistą w swojej dziedzinie. O Jego pozycji naukowej świadczy fakt, że był wielokrotnie powoływany przez redakcje międzynarodowych czasopism, do recenzowania artykułów naukowych. Na uwagę zasługuje także bardzo dobrze opanowany warsztat naukowy Kandydata, a Jego doświadczenie w badaniach możliwości zastosowania układów polimerowych w medycynie i farmacji, stanowi fundament do tworzenia nowych koncepcji. Ważne, by w dalszych poszukiwaniach skutecznych nośników leków zrezygnował ze stosowania toksycznych związków chemicznych, np. diizocyjanianów. Ostatnia uwaga nie wpływa na moją ogólną ocenę działalności naukowej dr inż. Marka Brzezińskiego. Uważam, że prowadzi badania na bardzo dobrym poziomie a uzyskane przez Niego wyniki znacząco wpływają na rozwój dyscypliny.

Na podstawie oceny zarówno cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych jak i pozostałego dorobku naukowego, uważam że dr inż. Marek Brzeziński spełnia wymagania *Regulaminu nadawania stopnia doktora habilitowanego w CBMiM PAN w Łodzi* z dnia 12 października 2020 i wnioskuję do Rady Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN o nadanie dr inż. Markowi Brzezińskiemu stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki chemiczne.

