

mgr Marcin Maćkiewicz
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski
Pracownia Teorii i Zastosowań Elektrod

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**„ ŚRODOWISKOWO-CZUŁE MIKROŻELE NA BAZIE N-IZOPROPYLOAKRYLOAMIDU.
SYNTEZA, WŁAŚCIWOŚCI I ZASTOSOWANIE”**

Promotor: prof. dr hab. Zbigniew Stojek

Intensywny rozwój nauki i techniki związany jest m.in. z poszukiwaniem zaawansowanych materiałów wykazujących nowe właściwości. Obecnie obserwuje się wzrost zainteresowania polimerowymi mikrożelami. Spowodowane jest to ich unikalnymi właściwościami fizykochemicznymi. Żele to polimery o usieciowanej budowie, które w odpowiednich warunkach pęczniają w rozpuszczalniku. Mikrożele są podobne do makrożeli, ale ponieważ mają koloidalne rozmiary, szybciej przystosowują się do warunków środowiskowych. Hydrożele absorbują dużą ilość wody i są biogodne. Hydrożele łączą w sobie cechy charakterystyczne dla cieczy i ciał stałych; małe cząsteczki mogą swobodnie dyfundować wewnątrz całej objętości żeli. Makrożele i mikrożele mogą występować w dwóch różnych stanach: spęczniałym i skurczonym, a przejście z jednego stanu w drugi nazywa się objętościowym przejściem fazowym (Volume Phase Transition – VPT). To odwracalne przejście fazowe następuje w odpowiedzi na zmiany warunków otoczenia takich jak: temperatura, pH, siła jonowa, obecność niektórych jonów, ciśnienie, skład rozpuszczalnika i promieniowanie elektromagnetyczne. W przeciwieństwie do makroskopowych żeli, mikrożele mają relatywnie większy obszar powierzchni dostępny do oddziaływania z substancjami chemicznymi znajdującymi się w otoczeniu mikrożelu. Dodatkowo ich małe rozmiary powodują, że znacznie szybciej reagują na zmiany bodźców środowiskowych oraz mogą być podawane do organizmu.

Obiektem moich badań były mikrożele oparte o czuły na temperaturę poli(*N*-izopropylakryloamid) (pNIPA). Usieciowane hydrożele pNIPA wykazują VPT przy temperaturze wyższej od 32°C. W temperaturze poniżej 32°C żele te występują w stanie spęczniałym (bogatym w rozpuszczalnik), natomiast powyżej tej temperatury występują w stanie skurczonym (zdehydratowanym, bogatym w polimer) o ograniczonej dostępności grup funkcyjnych. Dostępność grup funkcyjnych mikrożeli na bazie pNIPA może zwiększać się lub zmniejszać zależnie od temperatury czy pH, co ma wpływ na wiązanie i uwalnianie substancji związanych w mikrożelu. Mikrożele są swojego rodzaju zbiornikiem/rezerwuarem do magazynowania związków chemicznych, w tym farmaceutyków. Małe ich rozmiary powodują, że nie tylko szybko reagują na czynniki zewnętrzne, ale i szybko uwalniają substancje czynne. Funkcjonalizacja mikrożeli spowodowała, że cieszą się one coraz większym zainteresowaniem w medycynie, farmaceutyce, biochemii i ogólnie nanotechnologii. Znalazły one zastosowanie m.in. jako systemy dostarczania leków, sensory, katalizatory i urządzenia optyczne.

Głównym celem moich badań była synteza i charakterystyka nowych, środowiskowo-czułych mikrożeli, poprzez wprowadzenie do nich odpowiednich grup funkcyjnych i innych obiektów. Moim pierwszym zdefiniowanym zadaniem było otrzymanie mikrożelu czułego na temperaturę i pH, o właściwościach amfolytycznych i sorpcyjnych. Osiągnąłem to poprzez wprowadzenie do mikrożelu grup aminokwasowych. Stosując polimeryzację emulsyjną bez udziału surfaktanta, otrzymałem kilka nowych mikrożeli opartych na

N-izopropylakryloamidzie oraz naturalnym aminokwasie – L-ornitynie, zmodyfikowanym grupą akrylową. Zastosowanie pochodnej ornityny wyeliminowało konieczność jednoczesnego wprowadzania dwóch monomerów, jednego o charakterze kwasowym i drugiego zasadowego, i tym samym doprowadziło do szybszej syntetycznie rozwiniętej modyfikacji mikrożelu. Zbadałem wpływ pH, temperatury, stężenia jonów metali oraz zawartości monomeru modyfikującego na stopień napęcznienia mikrożeli. Obecność aminokwasu w sieci polimerowej mikrożeli dała możliwość kontrolowania ilości ładunków dodatnich oraz ujemnych w sieci polimerowej mikrożeli przez odpowiedni dobór wartości pH. Grupy aminokwasowe w mikrożelu mogły występować w postaci kationu ($-\text{NH}_3^+$), anionu ($-\text{COO}^-$) oraz jonu obojnaczego ($-\text{NH}_3^+$ razem z $-\text{COO}^-$). Mikrozele z 2% zawartością aminokwasu były niestabilne w badanym zakresie pH i agregowały po przekroczeniu temperatury objętościowego przejścia fazowego. Mikrozele z 8% zawartością AcOrn były stabilne w badanym zakresie pH i temperatury, wykazywały wrażliwość na zmiany temperatury, natomiast wrażliwość na zmiany pH była niewielka. Mikrozele z 20% zawartością aminokwasu wykazywały największe zmiany stopnia spęcznienia w odpowiedzi na zmiany temperatury, pH oraz stężenia jonów metali. W zakresie pH, w którym dominują zwitterjony (jony obojnacze), rozmiary mikrożeli były najmniejsze w każdych warunkach: przed i po przejściu fazowym. Powodowała to obecność zwitterjonów, prowadząca do zmniejszenia ciśnienia osmotycznego i zwiększenia sił przyciągania elektrostatycznego pomiędzy grupami o różnoimiennych ładunkach. Obecność aktywnych grup α -aminokwasowych przyczepionych do sieci polimerowej umożliwiła kompleksowanie niektórych kationów metali. Badając wpływ obecności Cu^{2+} oraz Ca^{2+} na napęcznienie mikrożeli (jony te różniły się znacznie zdolnością do tworzenia kompleksów z α -aminokwasami) okazało się, że obecność jonów miedzi, które tworzą stabilne kompleksy z α -aminokwasem, miała silny wpływ na stopień napęcznienia badanych mikrożeli. Obecność jonów miedzi(II) skutkowała zmniejszeniem rozmiarów mikrożeli, w każdych badanych przez mnie warunkach. Zdolność mikrożeli do wiązania jonów metali ciężkich oraz ich czułość na zmiany pH i temperatury czyni je interesującymi materiałami w procesach ekstrakcji. Ponadto obecność wolnych grup α -aminokwasowych przyłączonych do sieci polimerowej, stwarza możliwość dalszej modyfikacji mikrożelu, np. białkami, poprzez utworzenie wiązań z grupami α -aminokwasowymi.

Kolejnym celem pracy było wprowadzenie do mikrożelu pNIPA polimeru przewodzącego: polianiliny (PANI). Ideą było stworzenie prostego układu umożliwiającego wytworzenie materiału kompozytowego, który będzie posiadał właściwości typowe dla obu komponentów, czyli czułość na temperaturę typową dla mikrożelu pNIPA oraz elektroaktywność i przewodnictwo typowe dla polianiliny. Do realizacji powyższych zadań trzeba było wybrać właściwą metodę syntezy. Wykorzystując, opracowaną wcześniej w naszym zespole, tzw. polimeryzację międzyfazową otrzymałem kompozytowy mikrożel na bazie pNIPA i PANI. Kombinacja/połączenie termo-czulego mikrożelu i polianiliny doprowadziła do uzyskania materiału, który wykazywał właściwości charakterystyczne dla obu komponentów. Badania z użyciem SEM oraz TEM dowiodły, że mikrokompozyt tworzył sferyczne cząstki posiadające kalafiorowatą oraz chropowatą strukturę, o równomiernie rozłożonych w całej objętości mikrożeli nanowłóknach polianiliny. Mikrokompozyt wykazywał szybkie (< 0.7 s) oraz odwracalne przejście fazowe, wywołane zmianą temperatury. Zbliżona do czystego mikrożelu temperatura przejścia fazowego mikrokompozytu świadczyła, że PANI nie była związana chemicznie z siecią polimerową mikrożelu, lecz oddziaływała z nią fizycznie. Kurczenie się kompozytu pod wpływem wzrostu temperatury znacznie zwiększało sygnał voltamperometryczny, pochodzący od polianiliny. Równolegle jego przewodnictwo było o rząd wielkości większe od przewodnictwa niemodyfikowanego mikrożelu. Ewidentnie skurczenie mikrokompozytu poprawiało kontakt między włóknami polianiliny i większa ilość polianiliny uzyskiwała dostęp do powierzchni elektrody. Powyższe właściwość uczyniły mikrokompozyt

interesującym materiałem do np. wytwarzania przełączalnych systemów elektrochemicznych oraz sensorów.

Ostatnim, aplikacyjnym celem było stworzenie mikrożelowego nośnika leków. Moim zamiarem była synteza mikrożelu, który w odpowiednich warunkach ulegnie degradacji i w ten sposób uwolni umieszczony w nim wcześniej lek w komórce nowotworowej. W tym celu postanowiłem otrzymać mikrożel zawierający w sieci polimerowej redukowalne mostki disiarczkowe. Za pomocą polimeryzacji strąceniowej wprowadziłem do mikrożeli czułych na temperaturę (na bazie pNIPA) diakrylową pochodną cystyny. Zsyntezowane mikrożele tworzyły cząstki o budowie sferycznej, o zadowalająco wąskim rozkładzie wielkości. Pochodna cystyny była czynnikiem sieciującym nadającym mikrożelowi degradowalność (poprzez redukcję mostków –S–S–) oraz czułość na zmiany pH (spowodowaną obecnością grup karboksylowych). Największą wrażliwość na zmiany pH wykazywały mikrożele zawierające 3% linkera. Obecność grup karboksylowych w mikrożelach doprowadziła także do poprawy ich stabilności w roztworach o dużej mocy jonowej. Natomiast indukowana redukcją mostków –S–S– degradacja otrzymanych mikrożeli, za pomocą glutationu o stężeniu 0.01 M, prowadziła do zniszczenia sferycznych cząstek mikrożelu. Glutation jest zwykle obecny w znacznym stężeniu w komórkach nowotworowych. Wzrost zawartości diakrylowej pochodnej cystyny w mikrożelu prowadził do wzrostu zarówno temperatury objętościowego przejścia fazowego jak i stabilności otrzymanych mikrożeli. Mikrożel z 3% zawartością pochodnej cystyny był wysoce stabilny w szerokim zakresie temperatury, pH i siły jonowej, włączając w to warunki fizjologiczne (pH = 7.4, $C_{\text{NaCl}} = 0.15 \text{ M}$, $T = 37^\circ\text{C}$), jednak nie degradował całkowicie w obecności czynników redukujących. Natomiast mikrożel z najmniejszą zawartością czynnika sieciującego, tj. 1%, degradował całkowicie, ale nie był stabilny w warunkach fizjologicznych. Obecność grup karboksylowych w czynniku sieciującym pozwoliła również na zmagazynowanie doksorubicyny w mikrożelach (elektrostatyczne oddziaływanie grup aminowych leku ze zjonizowanymi grupami karboksylowymi mikrożelu), a następnie jej uwolnienie. Zaobserwowałem znaczny wzrost skumulowanego uwalniania DOX z mikrożelu w warunkach podobnych do warunków panujących w komórkach nowotworowych (pH ~ 5.0 oraz $C_{\text{glutation}} \sim 10 \text{ mM}$). Testy cytotoksyczności dowiodły, że mikrożel z 3% zawartością linkera zawierający zmagazynowany lek wykazywał cytotoksyczność wobec wybranych komórek rakowych jelita grubego podobną do leku w stanie wolnym niezwiązanym z mikrożelem. Natomiast sam mikrożel, niezwiązany z lekiem, nie hamował proliferacji komórek. W związku z powyższym otrzymane mikrożele stały się interesujące jako nośniki leku, które mogą być wykorzystane w systemach dostarczania leków. Obecność grup karboksylowych stwarza dalszą możliwość chemicznej modyfikacji mikrożeli poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy grupami aminowymi leku a grupami karboksylowymi mikrożelu.

Wyniki przedstawione w pracy doktorskiej i inne uzyskane w trakcie studiów doktoranckich opublikowane zostały w sześciu pracach naukowych w czasopiśmie o charakterze międzynarodowym: dwie w *Journal of Material Chemistry B*, dwie w *RSC Advances*, jedna w *Electroanalysis* i jedna w *Talanta*.