

Prof. dr hab. Alina Sionkowska  
Katedra Chemii Biomateriałów i Kosmetyków  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Toruń, dnia 17 sierpnia 2023r.

### Recenzja

pracy doktorskiej mgr Natalii Śmigiel-Gac pt. „Bioresorbowalne kopoliestry przeznaczone do zastosowań w inżynierii tkankowej, synteza i próby aplikacji”

Przedstawiona do recenzji praca wykonana została w CMPW PAN w Zabrze. Promotorami pracy są: prof. dr hab. Piotr Dobrzyński, oraz dr inż. Anna Smola-Dmochowska.

W ramach pracy doktorskiej zsyntezowano szereg poliestrów o potencjalnym zastosowaniu jako materiały biomedyczne. Założeniem było otrzymanie optymalnych bioresorbowalnych materiałów polimerowych, które charakteryzowałyby się biogodnością i łatwością modyfikacji.

Cel pracy Autorka zdefiniowała jako wyszukanie i otrzymanie optymalnych bioresorbowalnych materiałów polimerowych (kopolimerów i terpolimerów alifatycznych poliestrów, poliostroamin, poliamidoamin) biogodnych, o własnościach, pozwalających na relatywnie łatwą ich modyfikację białkami, czy innymi aktywnymi biologicznie związkami, jednocześnie spełniających wymagania zastosowania w inżynierii tkankowej, jako materiału do formowania trójwymiarowych podłoży komórkowych.

Postawiony cel badań jest bardzo aktualny ze względu na konieczność poszukiwania nowych biomateriałów w związku ze starzejącym się społeczeństwem i licznymi urazami komunikacyjnymi, również wśród osób młodych. Inżynieria tkankowa to cały czas prężnie rozwijająca się dziedzina zmierzająca do uzyskania biomateriałów przeznaczonych do tworzenia syntetycznych rusztowań komórkowych, które są niezbędne w wielu terapiach.

Przedstawiona do recenzji rozprawa zawarta jest na 228 stronach, składa się z wprowadzenia, części literaturowej, która stanowi część teoretyczną pracy i części doświadczalnej. W części teoretycznej Doktorantka dokonała przeglądu literatury dotyczącej tematyki doktoratu. Opisała ideę inżynierii tkankowej oraz takie pojęcia jak biozgodność, bioresorbowalność i biodegradacja. Opisała również wybrane monomery funkcyjne i ich potencjał w inżynierii tkankowej oraz metody otrzymywania bioresorbowalnych poliestrów. W części teoretycznej opisała również sposoby modyfikacji materiałów polimerowych oraz ogólne aspekty biodegradacji biomateriałów. Część teoretyczną kończą rozważania na temat metod formowania rusztowań do hodowli komórek.

Ta część rozprawy w opinii recenzenta przygotowana jest bardzo dobrze, Autorka cytuje 185 pozycji literaturowych z zakresu przedmiotu badań z ostatnich lat wskazując na rozeznanie tematyki na poziomie ogólnoswiatowym. W części doświadczalnej przedstawiono użyte materiały, wykorzystywane metody badawcze oraz zaprezentowano metodykę syntezy polimerów oraz ich charakterystyki. Część doświadczalna zawiera również wyniki, ich analizę, a także rozbudowaną dyskusję, opartą na szczegółowym przeglądzie literatury zawartym w części teoretycznej rozprawy. Część doświadczalna łącznie z dyskusją i podsumowaniem wskazuje na zrealizowanie postawionego celu pracy.

W celu osiągnięcia postawionych celów Autorka wykorzystwała metody badawcze adekwatne do stawianych wyzwań. Przebieg prowadzonych reakcji chemicznych był monitorowany poprzez rejestrację widm NMR i FTIR produktów, a następnie ich interpretację. Na uwagę zasługuje duża liczba otrzymanych związków i duża ilość wykonanych analiz NMR i FTIR. Do charakterystyki polimerów wykorzystano analizę DSC, pomiary lepkościowe, chromatografię GPC, pomiar kąta zwilżania oraz obrazowanie SEM. Wybrane materiały polimerowe formowano do postaci filmów polimerowych, elektroprzędzonych włókien oraz struktur 3D (tzw. rusztowań, czyli skafoldów). Rusztowania otrzymano metodą wmywania poroforu (kryształki NaCl), oraz metodą elektroprzędzenia w celu formowania porowatych mat. Przeprowadzono badania degradacji hydrolitycznej i enzymatycznej, badania biologiczne oraz mikrobiologiczne. Ilość przeprowadzonych syntez oraz ilość przeprowadzonych analiz jest imponująca i świadczy o ogromnym nakładzie pracy Doktorantki.

Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania obejmowały kilka etapów. W pierwszym etapie otrzymano grupę bioresorbowalnych kopolimerów blokowych wykorzystując polimeryzację ROP L-laktydu i kopolimeryzację L-laktydu z glikolidem, prowadzoną w obecności makroinicjatorów zakończonych grupami hydroksylowymi. Zbadano właściwości otrzymanych kopolimerów oraz stwierdzono, że zastosowana metoda syntezy pozwoliła wprowadzić boczne, aktywne chemicznie grupy hydroksylowe do głównego łańcucha końcowych kopolimerów, bez konieczności blokowania grupy hydroksylowej obecnej przy czwartorzędowym atomie węgla estrów kwasu cytrynowego. Stwierdzono, że najbardziej obiecującymi materiałami do formowania rusztowań mogą być terpolimery poli(L-laktydo-*ko*-glikolid)-*blok*-poli(bursztynian butylenu-*ko*-cytrynian butylenu). Na dobrym poziomie był wzrost i podział komórek na większości otrzymanych w tym etapie terpolimerów.

W kolejnym etapie przeprowadzona została kopolimeryzacja L-laktydu z glikolidem, zainicjowana wybranymi makroinicjatorami, w celu otrzymania szeregu biodegradowalnych blokowych terpolimerów amfifilowych zawierających w łańcuchu bloki hydrofobowe złożone z jednostek laktydylowych i glikolidylowych oraz z bloków hydrofilowych posiadających powtarzalne jednostki łańcucha zawierające grupy hydroksylowe i/lub aminowe. Autorka przedyskutowała problemy pojawiające się w tym etapie prowadzące do spadku masy cząsteczkowej i wzrostu dyspersji masy otrzymanych finalnie terpolimerów. Otrzymane w tym etapie terpolimery wykazały odpowiednią równowagę między hydrofobowością a hydrofilowością. Wykazywały zróżnicowane działanie antybakteryjne w zależności od rodzaju bakterii, a także w zależności od budowy badanego polimeru. Dla wszystkich otrzymanych poliestroamin wykazano działania bakteriostatyczne. Za szczególnie interesujące należy uznać właściwości amfifilowe uzyskanych materiałów.

W etapie następnym podjęto próbę otrzymania poliamidoamin. Przeprowadzono polikondensację na granicy faz z wybranymi poliaminami (norspermidyna, spermidyna i spermina z zablokowanymi grupami aminowymi drugorzędowymi) z dichlorkiem kwasu sebacynowego. Otrzymano poliamidoaminy o niezbyt wysokiej masie cząsteczkowej i umiarkowanej cytotoksyczności, uzależnionej od rodzaju komórek. Poliamidoaminy wykazywały również silny charakter amfifilowy, właściwości bakteriobójcze, a niektóre nawet słabą grzybobójczość.

Podsumowując, w wyniku przeprowadzonych badań Doktorantka otrzymała i przebadła szereg materiałów polimerowych, zbadała ich strukturę i właściwości, zbadała właściwości biologiczne i mikrobiologiczne. Rozprawa doktorska jest interdyscyplinarna i łączy nauki chemiczne z inżynierią biomateriałów. Bez wątplenia otrzymane wyniki badań stanowią element nowości i wnoszą elementy nowości do istniejącego stanu wiedzy.

Przeprowadzone badania i ich wyniki potwierdziły, że założony cel pracy doktorskiej został zrealizowany. Otrzymano szereg nowych materiałów polimerowych, potwierdzono ich biozgodność, biodegradację, a dla niektórych otrzymanych polimerów również właściwości biobójcze. Wykazano możliwość sterowania właściwościami takimi jak hydrofilowość/hydrofobowość, profil degradacji, krystaliczność czy aktywność biologiczna. Podjęto próbę wykazania, że otrzymane polimery mogą być atrakcyjne do wykorzystania w inżynierii tkankowej, jak również możliwe jest wykorzystanie właściwości amfifilowych opisanych materiałów w tworzeniu mikro- i nanonośników substancji czynnych w medycynie i kosmetologii. Adhezja komórek do biomateriału a także przyłączanie białek i substancji czynnych są uzależnione od hydrofilowości powierzchni, dlatego też uzyskane wyniki mogą mieć duże znaczenie praktyczne.

Po przeczytaniu rozprawy doktorskiej nasuwają się pewne pytania, które mogą posłużyć do dyskusji w czasie obrony:

1. Na str. 91 widnieje sformułowanie, że proces elektroprzędzenia „wykonano w naszej pracowni”. Nie podano nazwy aparatu ani parametrów elektroprzędzenia. Czy używano aparatu własnej konstrukcji czy aparatu komercyjnego?

2. Czy brano pod uwagę przesunięcia pasm na widmach IR spowodowane oddziaływaniami wodorowymi? Na stronie 173 wspomniano, że mogą występować oddziaływania międzycząsteczkowe, jednak nie wymieniono jakie.
3. W celu zsyntezowania poliamidoamin wykorzystywano w pracy dichlorek sebacynowy (str. 134, schemat 5.3.1.). Czy inne chlorki kwasowe mogłyby być rozważane do syntezy poliamidoamin?
4. Czy i w jakim stopniu reakcje „odbezpieczania” zablokowanych grup mogły wpływać na średnią masę cząsteczkową otrzymywanych polimerów i na dyspersję masy?

Rozprawa doktorska napisana jest poprawnym językiem polskim, jednakże wkradło się sporo błędów literowych i stylistycznych. Są też zawarte sformułowania żargonowe, które używane w pracy laboratoryjnej nie powinny być przenoszone do treści dysertacji. Ładna jest natomiast szata graficzna rozprawy doktorskiej, duża liczba schematów i rysunków świadczy o dużej liczbie otrzymanych wyników. Niektóre rysunki ze względu na zbyt małą czcionkę nie są jednak czytelne i trudno śledzić szczegóły.

Wymienię niektóre usterki, celem wskazania na co zwrócić uwagę w kolejnych pracach:

1. Sporo jest błędów tzw. literówek, np. na str. 4, 6, 8, 13, 53, 55, 57, 58, 77 i wielu innych stronach;
2. W tabeli zamieszczonej na str. 63 niektóre słowa są nieczytelne;
3. Często występują sformułowania żargonowe, np. na str. 28 „tleny karbonylowe”;
4. Na str. 86 występuje inny tytuł podrozdziału niż w spisie treści na str. 5 (podobna niezgodność dotyczy str. 95 i 153);
5. Sformułowanie „przy intensywnym mieszaniu reakcji” na str. 77 jest dość niefortunne, mieszamy raczej reagenty lub mieszaninę reakcyjną, nie zaś reakcję;
6. Na rys. na str. 129 brakuje osi.
7. Na stronie 103 jest podany skrót NG-53 którego nie ma w spisie skrótów; nieścisłość w używaniu skrótu dotyczy również rozszerzenia skrótu NLH51 (różnie podany na str. 14 i 127). Skrót PAA wyjaśniony w spisie skrótów jako poli(kwas krylowy) stosowany jest w dysertacji do opisywania poliamidoamin jako PAA1, PAA2 i PAA3 (te skróty nie są wyjaśnione w spisie skrótów). Nieścisłości w używaniu skrótów widać też w tabeli 5.7.1.1.
8. Sformułowanie na str. 135 „Zmiany w widmach NMR obserwowane po reakcji roztworu tych terpolimerów z trichloroacetyloizocyjanianem dowodzą, prawidłowego przypisania sygnałów”. Zmiany w widmie raczej dowodzą, że zaszły odpowiednie procesy lub reakcje chemiczne.
9. Cytowana literatura jest podawana przez Doktorantkę w chaotyczny sposób, np. niektóre cytowane pozycje mają podany zakres stron, inne tylko pierwszą stronę. Przy niektórych cytacjach jest podany tylko rok bez dalszych szczegółów (np. cytacja 14 i 21). W niektórych pozycjach brakuje nazwy czasopisma (np. w pozycji 34 i 94). Nie konsekwentnie są też wpisywane znaki interpunkcyjne w spisie literatury.

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że postawione przeze mnie pytania i nieliczne uwagi nie obniżają wartości merytorycznej pracy. Doktorantka zrealizowała postawiony cel pracy i uzyskała wartościowe wyniki, które dokładnie opracowała i przedyskutowała. Na szczególne podkreślenie zasługuje interdyscyplinarne podejście do badanego problemu oraz ogromny nakład pracy przy przeprowadzonych syntezach oraz interpretacji wyników.

Praca zawiera dużo oryginalnych wyników o potencjalnym zastosowaniu w praktyce, a do najważniejszych osiągnięć rozprawy zaliczam:

1. Otrzymanie grupy poliestrów z bocznymi grupami hydroksylowymi;
2. Otrzymanie grupy ciekawych amfifilowych poliestroamin o działaniu antybakteryjnym;
3. Otrzymanie grupy poliamidoamin o zmodyfikowanych właściwościach hydrofilowych;
4. Przygotowanie filmów, włókien oraz rusztowań z wybranych polimerów i zbadanie ich właściwości;
5. Zbadanie właściwości biologicznych i mikrobiologicznych otrzymanych materiałów.

Biorąc pod uwagę całość badań, oryginalność i jakość wyników a także rozbudowaną ich dyskusję oraz potencjalną wartość praktyczną uważam, że praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim przez ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym (ustawa z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2018 poz.1668 z późn. zm.)). Wnoszę o dopuszczenie mgr Natalii Śmigiel-Gac do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Alina Sionkowska