**AGH**AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki

KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I KOMPOZYTÓW

Dr hab. inż. Kinga Pielichowska, prof. AGH

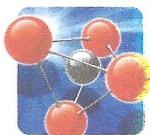
Kraków, 4.09.2023

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

Praca doktorska Pani mgr Natalii Śmigiel-Gac pt. „Bioresorbowalne kopoliestry przeznaczone do zastosowań w inżynierii tkankowej, synteza i próby aplikacji” została wykonana w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk w Zabrze pod opieką naukową Pana prof. dr hab. Piotra Dobrzyńskiego (promotor) i Pani dr inż. Anny Smola-Dmochowskiej (promotor pomocniczy).

Znaczenie problematyki

Tematyka przedstawionej do oceny pracy doktorskiej dotyczy intensywnie rozwijanego w ostatnich latach obszaru badawczego, jakim są nowe bioresorbowalne materiały polimerowe do zastosowań biomedycznych. Obecnie jako bioresorbowalne materiały polimerowe w zastosowaniach implantacyjnych i inżynierii tkankowej powszechnie stosowane są polimery z grupy poliestrów, takie jak polilaktyd, poli(laktyd-ko-glikolid) czy poli(ϵ -kaprolakton). Jednakże nie są one materiałami pozbawionymi wad. Zatem celowe jest poszukiwanie nowych polimerów biodegradowalnych o właściwościach polepszonych w stosunku do obecnie już stosowanych. W literaturze opisywane są różne koncepcje i metody pozwalające na modyfikację wybranych właściwości poliestrów biodegradowalnych. Jedną z nich jest kopolimeryzacja z wykorzystaniem wybranych monomerów funkcyjnych, których wprowadzenie do struktury łańcucha poliestrowego pozwala na znaczą modyfikację właściwości fizykochemicznych otrzymanego kopolimeru w porównaniu do polimeru wyjściowego i odpowiedzi komórkowej. W szczególności dotyczy

**WIMiC****Akademia Górniczo-Hutnicza | Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
Katedra Biomateriałów i Kompozytów**al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków,
tel. +48 12 617 44 47, fax +48 12 12 617 33 71
e-mail: biomat@agh.edu.pl

to monomerów, które pozwolą na wprowadzenie do łańcucha głównego grup hydroksylowych, karboksylowych lub aminowych. W świetle przedstawionych informacji, zastosowanie jako monomerów funkcyjnych związków takich jak kwas cytrynowy, kwas bursztynowy czy winowy jest jak najbardziej celowe. W pełni uzasadnia to również wybór tematyki badawczej recenzowanej pracy doktorskiej.

Układ rozprawy doktorskiej i zastosowane piśmiennictwo

Rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Śmigiel-Gac liczy łącznie 229 stron i składa się z dziewięciu rozdziałów. Na początku pracy umieszczono spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz stosowanych skrótów i symboli. Pierwszy rozdział stanowi kilkustronicowe wprowadzenie do pracy. Rozdział drugi zawiera część literaturową pracy, a w rozdziale kolejnym zapoznać się można z celem i zakresem pracy. Kolejną, zasadniczą część pracy stanowi część doświadczalna zawierająca spis stosowanych materiałów, opis procedury modyfikacji grup funkcyjnych w monomerach, opis syntez makroiniciatorów, syntezy terpolimerów L-laktydu i glikolidu zawierających w łańcuchu bloki poliestrów i poliestroamin, syntezy poliamidoamin oraz procedury odblokowywania grup funkcyjnych w syntezowanych polimerach. Rozdział ten zawiera również informacje dotyczące metod badawczych stosowanych do charakterystyki otrzymywanych oligomerów i polimerów na poszczególnych etapach prac badawczych, jak również opis metod formowania otrzymanych polimerów oraz badań procesu degradacji hydrolitycznej oraz badań biologicznych. Rozdział piąty pracy zawiera prezentację uzyskanych wyników badań wraz z ich opisem, a rozdział siódmy podsumowanie i wnioski. Dalej kolejno znajdują się: wykaz dorobku naukowego Doktorantki, spis rysunków, schematów i tabel oraz wykaz cytowanej literatury.

Część literaturowa pracy obejmuje 43 strony i zawiera podstawowe informacje dotyczące problematyki badawczej poruszanej w niniejszej rozprawie doktorskiej. Pierwszy podrozdział poświęcony jest tematyce związanej z inżynierią tkankową, w tym rusztowaniom przeznaczonym do hodowli komórek, zagadnieniom związanym z bioresorbowalnością, biogodnością i właściwościami antybakteryjnymi biomateriałów polimerowych, jak również polimerom stosowanym w inżynierii tkankowej wraz ze wskazaniem wpływu poszczególnych grup funkcyjnych w strukturze polimeru na wybrane właściwości biomateriałów polimerowych. Kolejny podrozdział dotyczy monomerów funkcyjnych, których użycie może w znaczący sposób zmienić właściwości otrzymywanych biomateriałów, np. kwasu cytrynowego, kwasu bursztynowego i kwasu L-winowego. Omówiono również możliwość zastosowania w inżynierii tkankowej dietyloaminy oraz poliamin. W podrozdziale 2.3 omówiono sposoby modyfikacji materiałów polimerowych, w tym zabezpieczania grup hydroksylowych i aminowych w monomerach oraz mechanizmy

tworzenia karboamin i imin. Kolejny podrozdział poświęcony został metodom otrzymywania bioresorbowalnych poliestrów – omówione zostały procesy, polikondensacji, polikondensacji w stopie i międzyfazowej, polimeryzacji z otwarciem pierścienia (ROP), transestryfikacji oraz polimeryzacji enzymatycznej. Ostatnie dwa podrozdziały tej części pracy zawierają informacje dotyczące degradacji biomateriałów i formowania polimerów w celu otrzymania rusztowań do hodowli komórek. Ta część pracy stanowi interesujące kompendium wiedzy dotyczące biodegradowalnych poliestrów i metod ich modyfikacji w kontekście zastosowań w inżynierii tkankowej. Część literaturowa pracy została właściwie zaplanowana, stanowi rzeczowe i poprawnie ujęte wprowadzenie do zagadnień i problemów poruszanych w dalszych rozdziałach pracy. Wykaz literatury liczy 185 pozycji. Doktorantka pisząc pracę korzystała głównie z najnowszych doniesień literaturowych opublikowanych w uznanych czasopismach z ostatnich piętnastu lat. Dobór źródeł literaturowych jest zgodny z omawianą tematyką badawczą.

Praca napisana jest poprawnym językiem. Autorka nie ustrzegła się jednak drobnych błędów, np. :

- str. 12, wykaz stosowanych skrótów oraz str. 72, spis odczynników – pojawiają się nadmiarowe odstępki pomiędzy poszczególnymi członami nazw chemicznych związków, np. poli L-laktyd, trietylo cytrynian,
- str. 12, wykaz stosowanych skrótów – braki fragmentów nazw lub nieprawidłowa odmiana nazwy, np. Boc - t-butoksykarbonylowa, PBS – polibursztynian, PAA - poli(kwasu akrylowego), Ti(Obu)₄ - butyloksy tytanu (IV), TEC - kwasem trikarboksylowym;
- str. 20, Rys. 2.1 – niezbyt fortunny podpis rysunku: „Etapy medycyny regeneracyjnej...”;
- brak tłumaczeń rysunków zaczerpniętych z literatury anglojęzycznej na język polski;
- numeracja rysunków, schematów i tabel - zastosowany sposób numeracji może być nieco mylący dla czytelnika, przykładowo na jednej stronie znajdują się obiekty o takim samym numerze rysunek i schemat (np. na str. 40).

Cel pracy i zastosowana metodyka badawcza

Zasadniczym celem pracy było „uzyskanie bioresorbowalnych materiałów polimerowych (kopolimerów i terpolimerów alifatycznych poliestrów, poliestroamin, poliamidoamin) zgodnych biologicznie, o zoptymalizowanych własnościach, mających potencjalne zastosowanie w inżynierii tkankowej, jako trójwymiarowe podłoża komórkowe”. Zakres realizowanych prac badawczych obejmował:

- przegląd literatury naukowej (w szczególności z ostatnich kilkunastu lat) dotyczącej inżynierii tkankowej oraz biodegradowalnych poliestrów, sposobów ich modyfikacji i formowania;
- otrzymanie monomerów funkcyjnych – dokonano modyfikacji wybranych monomerów poprzez selektywne blokowanie grup hydroksylowych, pierwszorzędowych i drugorzędowych aminowych;
- otrzymanie makroinicjatorów o założonej masie cząsteczkowej i łańcuchach zakończonych grupami hydroksylowymi;
- otrzymanie makroinicjatorów oligoamidoimin z zablokowanymi grupami aminowymi w aminach endogennych metodą polimeryzacji na granicy faz;
- syntezę kopolimerów i terpolimerów metodą polimeryzacji ROP wychodząc z cyklicznych monomerów L-laktydu i glikolidu z wykorzystaniem otrzymanych wcześniej oligomerów jako makroinicjatorów;
- modyfikację otrzymanych terpolimerów poprzez odblokowanie zabezpieczonych grup hydroksylowych oraz usunięcie grup tert-butyłowych w celu otrzymania aktywnych grup aminowych;
- próby otrzymania rusztowań metodą elektroprzędzenia oraz wymywania porogenu;
- badania degradacji hydrolitycznej i enzymatycznej oraz zwilżalności otrzymanych materiałów;
- badania biologiczne na wybranych liniach komórkowych oraz badania bakteriobójczości.

Na poszczególnych etapach badań otrzymywane oligomery i polimery badano za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), spektroskopii w podczerwieni (FTIR), różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC), chromatografii żelowej (GPC) oraz skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Ponadto wykonywano pomiary kąta zwilżania, lepkości zredukowanej, oznaczano grupy hydroksylowe, jak również ocenę właściwości biologicznych.

Wyniki badań i dyskusja

W części doświadczałnej rozprawy doktorskiej zawarto spis używanych materiałów i odczynników, opis prowadzonych syntez, formowania otrzymanych kopolimerów oraz opis używanej aparatury badawczej. Na uwagę zasługuje szeroki zakres prac, jakie Pani mgr Natalia Śmigiel-Gac wykonała prowadząc kolejne syntezы oraz konsekwentnie charakteryzując otrzymywane produkty przy zastosowaniu wybranego zestawu metod badawczych.

Rozdział piąty poświęcony jest prezentacji wyników badań i ich omówieniu. W podrozdziale 5.1 przedstawiono badania związane z syntezą i charakterystyką

terpolimerów L-laktydu i glikolidu zawierających blok bursztynianu butylenu i/lub cytrynianu butylenu, w podrozdziale 5.2 terpolimerów L-laktydu i glikolidu zawierających grupy hydroksylowe oraz aminowe. Rozdział 5.3 poświęcony jest syntezie i charakterystyce poliamidoamin otrzymanych w reakcji dichlorku sebacynowego z pochodnymi wybranych poliamin. Kolejny podrozdział zawiera wyniki badań biokompatybilności otrzymanych poliamidoamin oraz ich właściwości bakteriobójczych. Dwa ostatnie podrozdziały dotyczą badania procesów biodegradacji hydrolitycznej i enzymatycznej otrzymanych materiałów oraz podjętych prób formowania rusztowań do hodowli komórkowych.

Analizując część doświadczalną pracy można stwierdzić, że została ona właściwie zaplanowana, a uzyskane wyniki odpowiednio opracowane i właściwie zinterpretowane. Dowiedziono, że poprzez odpowiedni dobór monomerów i wprowadzanie wybranych grup funkcyjnych można otrzymać różnorodne polimery biodegradowalne o kontrolowanych właściwościach fizycznych, szybkości biodegradacji i dobrej biokompatybilności. W efekcie przeprowadzonych badań otrzymano szereg bioresorbowalnych materiałów polimerowych takich jak kopolimery i terpolimery alifatycznych poliestrów, poliestroaminy i poliamidoaminy, charakteryzujące się obiecującymi właściwościami w kontekście zastosowań w inżynierii tkankowej. W odniesieniu do tej części pracy nasuwają się następujące komentarze i uwagi:

- str. 88 – prowadząc badania DSC należy stosować naważki o zbliżonych masach, podczas gdy Doktorantka stosowała naważki 10-20 mg, a zatem w skrajnych przypadkach jedne próbki mogły być nawet dwukrotnie większe od drugich; ponadto zgodnie z zaleceniami norm ISO masa próbki powinna wynosić 5 do 10 mg;
- str. 97 – nieprawidłowa jednostka na osi Y;
- str. 101, Tabela 5.1.1.1 – jak wytłumaczyć tak duże różnice w dyspersyjności otrzymywanych oligomerów?
- str. 103 – porównując dane z Tabeli 5.1.1.1 z przebiegiem odpowiednich krzywych DSC trudno zauważyć wskazany w tabeli trend - w jaki sposób wyznaczano temperaturę zeszklenia badanych układów (jako punkt przegięcia pierwszej pochodnej krzywej DSC czy jako tzw. midpoint)?
- w wielu miejscach w pracy pojawia się odniesienie do krystaliczności otrzymywanych materiałów – czy obliczano stopień krystaliczności? Trudno bezpośrednio porównywać ciepła topnienia i na tej podstawie wyciągać wnioski odnośnie krystaliczności, ze względu na różny udział poszczególnych komonomerów w otrzymywanych kopolimerach;
- badania FTIR – czy analizowano uzyskane wyniki po kątem oddziaływań wodorowych i ich wpływu na strukturę i właściwości otrzymywanych materiałów?

- str. 189 – na przedstawionych rysunkach brak jest słupków błędów, jakie było odchylenie standardowe dla zaprezentowanych badań?
- str. 199 – niezbyt fortunne określenie „silnie semikrystaliczne domeny”, raczej powinno mówić się o domenach o wysokim stopniu uprządkowania łańcuchów polimerowych lub mniej zdefektowanych krystalitach w obrębie fazy krystalicznej, itp.
- str. 206 – „w obecności jednostek cytrynianowych i bursztynianach powstaje silna transestryfikacja międzycząsteczkowa”?

Powyższe uwagi krytyczne i komentarze, do których jak sądzę Kandydatka odniesie się podczas obrony pracy, nie wpływają na zdecydowanie pozytywną ocenę całej pracy, w której zaplanowane i poprawnie przeprowadzone badania doprowadziły do zrealizowania postawionego na początku celu pracy. Mgr Śmigiel-Gac otrzymała szereg kopoliestrów o zróżnicowanych właściwościach oraz wykazała, że na drodze kopolimeryzacji poprzez odpowiedni dobór sposobu syntezy oraz monomerów możliwe jest sterowanie właściwościami poliestrów, takimi jak hydrofilowość/hydrofobowość, szybkość degradacji, krystaliczność czy aktywność biologiczna. Na szczególną uwagę zasługuje szerokie ujęcie zaprezentowanej tematyki, przeprowadzenie szeregu syntez oraz systematyczna i obszerna charakterystyka otrzymywanych oligomerów i polimerów. Zakres pracy oraz jakość uzyskanych wyników świadczy o tym, że Kandydatka opanowała metody syntezy polimerów, ich formowania, jak również metody charakteryzowania przy użyciu różnorodnych technik badawczych. Potwierdza to również odpowiednie teoretyczne przygotowanie oraz umiejętność prowadzenia badań naukowych przez Doktorantkę w uprawianej dyscyplinie nauki.

Głównym osiągnięciem Doktorantki będącym oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego było otrzymanie i scharakteryzowanie szeregu nowych kopoliestrów o właściwościach pożądanych pod kątem zastosowań biomedycznych poprzez wprowadzenie do głównego łańcucha grup amidowych, peptydów, sekwencji estrów kwasów obecnych w cyklu Krebsa (kwas cytrynowy, kwas bursztynowy) czy grup hydroksylowych lub aminowych. Tego rodzaju modyfikacja może pozwolić na wyciszenie odpowiedzi zapalnych, jak również wspomagać adhezję i proliferację komórek.

Wnioski końcowe

Wyniki przeprowadzonych badań, opisane w recenzowanej pracy, mają duże znaczenie naukowe i wnoszą istotny wkład w wiedzę w zakresie otrzymywania nowych kopoliestrów. Opracowanie metod syntezy i scharakteryzowanie nowych kopoliestrów zawierających wybrane monomery funkcyjne (kwas cytrynowy, kwas bursztynowy, kwas L-winowy) stanowi element nowości naukowej, a uzyskane wyniki badań mogą być wykorzystane w przyszłości w praktyce, w szczególności w zastosowaniach biomedycznych

w miejsce obecnie stosowanych powszechnie poliestrów, takich jak PLA i PLGA. Tematyka rozprawy korzystnie wpisuje się w aktualne trendy w badaniach nad opracowaniem kolejnych generacji nowoczesnych biomateriałów polimerowych.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Śmigiel-Gac pt. „Bioresorbowalne kopoliestry przeznaczone do zastosowań w inżynierii tkankowej, synteza i próby aplikacji” spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z 16.04.2003 r., wraz z późniejszymi zmianami) i wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Natalii Śmigiel-Gac do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, ze względu na bardzo szeroki zakres wykonanych badań połączony z dokładną charakterystyką otrzymanych układów, nowatorski charakter przeprowadzonych prac oraz znaczący dorobek naukowy doktorantki wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalii Śmigiel-Gac.

Kinga Pielichowska