



prof. dr hab. inż. Mirosława El Fray

tel: (+48) 91 499 48 28
fax: (+48) 91 499 40 98
Email: mirfray@zut.edu.pl

Ocena pracy doktorskiej Pani **mgra inż. Pawła Chabera**

pt.: „**Modyfikowane biopoliestry alifatyczne do zastosowań w inżynierii tkankowej**”

zrealizowanej pod kierunkiem promotora,
prof. dr hab. Grażyny Adamus

Recenzja została opracowana na podstawie uchwały Rady Naukowej Centrum
Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN z dnia 23 czerwca 2023.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska ma formę rozprawy, której treści Autor zamieścił na 183 stronach maszynopisu. Rozprawa składa się z 7 rozdziałów, z których zasadnicze to przegląd literatury, informacja o celu i zakresie pracy oraz omówienie wyników badań, z podsumowaniem i wnioskami końcowymi. Autor na końcu przedstawił opis części eksperymentalnej i bibliografię, na którą składa się 450 pozycji literaturowych. Praca zawiera również streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz dorobku naukowego Doktoranta. Ocenę merytoryczną i naukową pracy doktorskiej pragnę przedstawić w następujących punktach.

1. Aktualność tematu
2. Analiza doboru technik eksperymentalnych i metodyk badawczych
3. Elementy nowości w pracy
4. Uwagi dyskusyjne
5. Wnioski końcowe

Aktualność tematu pracy

Biopolimery, a zwłaszcza bakteryjne poliestry, stanowią obiekt intensywnych badań naukowych nad ich wykorzystaniem w leczeniu i zastępowaniu chorych lub uszkodzonych tkanek, organów lub narządów, a zwłaszcza w inżynierii tkankowej. Autor dokonał przeglądu literatury dotyczącej polihydroksyalkanianów (PHA), przedstawiając najważniejsze grupy tych materiałów. Autor w swoich badaniach skupił się na poli(3-hydroksymaślanie (PHB) oraz poli(3-hydroksymaślanie-*ko*-3-hydroksywalerianie)(PHBV) jako najlepiej poznanymi poliestrami bakteryjnymi, z dobrze zdefiniowaną budową chemiczną i opanowanymi procesami ich produkcji. Ich kluczową zaletą jest podatność na biodegradację w różnych warunkach oraz resorbowalność. Z kolei wysoka biogodność z komórkami i tkankami wskazuje na możliwości stosowania tych polimerów w medycynie. Jednak ich hydrofobowość, sztywność i kruchość (spowodowane głównie wysokim stopniem krystaliczności) są przesłankami wskazującymi na potrzebę modyfikacji chemicznej PHA w celu nadania tym materiałom pożądanych właściwości użytkowych. Dlatego też takie metody jak reakcje szczepienia kopolimerów, degradacja krótkich łańcuchów lub polimeryzacja w kierunku syntezy kopolimerów blokowych prowadzą do zmian w krystaliczności, temperatury topnienia lub zeszklenia i tym samym do zwiększenia ich podatności na degradację i przydatności w inżynierii tkankowej.

Na podstawie dokonanego przeglądu literatury, Doktorant postanowił opracować nowe metody modyfikacji biopoliestrów PHB i PHBV oraz przeprowadzić syntezy nowych biomateriałów polimerowych dla zastosowań w medycynie regeneracyjnej.

Głównym celem pracy było opracowanie metody heterogenicznej redukcji PHB i PHBV z wykorzystaniem LiBH_4 , którą wykorzystał również do modyfikacji struktury chemicznej powierzchni wyrobów wytworzonych z biopoliestrów PHB i PHBV w formie kształtek, filmów polimerowych, jak również wyrobu stanowiącego potencjalne rusztowanie tkankowe w formie włóknistej maty wytworzonej metodą elektroprzędzenia. Uwaga Doktoranta była skupiona przede wszystkim na zastosowaniu łagodnych warunków temperaturowych i niskiego stężenia czynnika redukującego. Co więcej, otrzymane makromonomery oligo-3-hydroksymaślanowe zakończone grupami hydroksylowymi wykorzystał do syntezy kopolimerów zawierających segmenty strukturalne pochodzące od oligo-3-hydroksymaślanu oraz kwasów sebacynowego i adypinowego i 1,4 butandiolu.

Analiza doboru technik eksperymentalnych i metodyk badawczych

Kluczowym elementem prac badawczych prowadzonych przez Doktoranta było opracowanie metody heterogenicznej redukcji PHB i PHBV z wykorzystaniem LiBH_4 , którą wykorzystał również do modyfikacji struktury chemicznej powierzchni wyrobów wytworzonych z biopoliestrów PHB i PHBV w formie kształtek, filmów polimerowych, jak również włóknistych mat wytworzonych metodą elektroprzędzenia. Doktorant zastosował szereg nowoczesnych metod badawczych do scharakteryzowania struktury i właściwości materiałów polimerowych poddawanych modyfikacji oraz uzyskanych produktów reakcji, w tym spektroskopię w podczerwieni (FT-IR), magnetycznego

rezonansu jądrowego (^1H NMR) oraz spektrometrię mas (ESI-MS). Dokonał również charakterystyki właściwości powierzchniowych poprzez przeprowadzenie pomiarów kąta zwilżania dowodząc, że zmodyfikowane wyroby poliestrowe cechują się większą zawartością powierzchniowych polarnych grup hydroksylowych niż wyroby niezmodyfikowane. Doktorant przeprowadził pomiary zmian wartości M_n i stopnia krystaliczności stosując technikę chromatografii żelowej (wykluczania)(GPC) i różnicową kalorymetrię skaningową (DSC). Doktorant przeprowadził również badania cytotoksyczności zgodnie z normą ISO 10993-5-2009, z wykorzystaniem komórek mysich fibroblastów L929 oraz komórek osebblastopodobnych stosując obserwację morfologii komórek techniką skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Wykorzystanie różnorodnych technik eksperymentalnych pozwoliło Doktorantowi dosyć dobrze scharakteryzować badane materiały polimerowe.

Podsumowując, należy stwierdzić, że zastosowane zostały nowoczesne techniki eksperymentalne i metody badawcze adekwatne do zaplanowanego programu badawczego, które pozwoliły Doktorantowi na poprawne wyciągnięcie wniosków.

Elementy nowości w pracy

Przedmiotem badań Doktoranta były komercyjnie dostępne PHB i PHBV poddawane reakcji redukcji zachodzącej w układzie dwufazowym z wykorzystaniem LiBH_4 do redukcji grup estrowych biopoliestrów. Redukcję prowadzono w układzie heterogenicznym, w którym PHB stanowił fazę stałą, a eterowy roztwór LiBH_4 – fazę ciekłą. W wyniku opracowanej metody redukcji otrzymano jednorodne oligomery 3-hydroksymaślanu o kontrolowanych masach molowych zakończone hydroksylowymi grupami końcowymi. Przeprowadzone badania wykazały, że przebieg procesu redukcji biopoliestru PHB przy użyciu LiBH_4 zależy od rodzaju użytego w reakcji rozpuszczalnika, czasu prowadzenia reakcji oraz stężenia środka redukującego. Doktorant po raz pierwszy opisał reakcję przegrupowania oligomerów 3HB zakończonych grupą 1-metylo-3-hydroksypropylową – reakcji wewnątrzcząsteczkowej transestryfikacji, o tyle interesującej, że przebiegającej w temperaturze pokojowej i bez udziału katalizatora.

Otrzymane na drodze redukcji biopoliestru PHB oligomery 3-hydroksymaślanu zakończone hydroksylowymi grupami końcowymi Doktorant wykorzystał jako makromonomery w reakcji polikondensacji z dichlorkiem kwasu sebacynowego. Otrzymane kopolimery PHBSA charakteryzowały się niższą o około 30 °C temperaturą topnienia w porównaniu do PHB o zbliżonej średniej masie molowej. W efekcie wprowadzenia kwasu sebacynowego zmniejszył się również stopień krystaliczności kopolimeru w porównaniu do wyjściowego biopoliestru.

Opracowaną metodę heterogenicznej redukcji PHA Doktorant wykorzystał również do modyfikacji struktury chemicznej powierzchni wyrobów wytworzonych z biopoliestrów PHB i PHBV. Zmodyfikowane powierzchnie wyrobów otrzymano prowadząc redukcję w bardzo łagodnych warunkach, przy niskim stężeniu czynnika redukującego. W następstwie reakcji z zastosowaniem LiBH_4 hydrofobowa powierzchnia krążków i filmów wytworzonych z PHBV stała się hydrofilowa. Doktorant wykazał, że hydrofilowość powierzchni zwiększała się zarówno z czasem trwania modyfikacji, jak i ze wzrostem stężenia czynnika modyfikującego. W efekcie użycia roztworu LiBH_4

zmniejszyła się średnia masa molowa i zwiększył stopień krystaliczności próbek badanych wyrobów. Zmiany wartości M_n i stopnia krystaliczności były tym większe, im dłużej prowadzona była redukcja oraz roztwór LiBH_4 był bardziej stężony.

Wyniki badań przeprowadzonych metodą GPC wskazały ponadto, że reakcję degradacji można ograniczyć do zewnętrznych warstw mikrowłókien, a maty zachowują swoje właściwości morfologiczne i mechaniczne oraz nie tracą włóknistej struktury.

Przeprowadzone badania biologiczne wykazały, że zmodyfikowane włókniste maty z PHBV nie są cytotoksyczne w stosunku do mysich fibroblastów linii L929. Oddziaływanie włóknistych mat na komórki linii SaOS-2 zależało od stopnia zmodyfikowania włókien. Jednak wydłużenie czasu modyfikacji oraz zwiększanie stężenia czynnika redukującego obniżało żywotność i proliferację komórek.

Doktorant przeprowadził również syntezę kopolimerów zawierających segmenty strukturalne pochodzące od oligo-3-hydroksymaślanu, wbudowanego bezwodnika adypinowego i 1,4 butandiolu. Kopolimery PHBBA otrzymał na drodze trój etapowej syntezy obejmującej transestryfikację biopoliestru PHB za pomocą 1,4-butanodiolu, estryfikację zsyntezowanych oligoestrodiole cyklicznym bezwodnikiem adypinowym oraz polikondensację otrzymanego makromonomeru z użyciem 1,4 butandiolu.

Doktorant wykazał, że otrzymane kopolimery charakteryzowały się niższym stopniem krystaliczności oraz niższą o ponad 30 °C temperaturą topnienia w porównaniu do biopoliestru PHB o zbliżonej średniej masie molowej. Ponadto, wprowadzenie do łańcucha głównego PHB merów pochodzących od 1,4-butanodiolu i kwasu adypinowego skutkowało zwiększeniem jego elastyczności.

Uwagi dyskusyjne

W pracy Doktorant zajął się modyfikacją biopoliestrów PHB i PHBV metodą heterogenicznej redukcji z wykorzystaniem LiBH_4 , oraz przeprowadził syntezę nowych biomateriałów polimerowych dla zastosowań w medycynie regeneracyjnej.

Doktorant przeprowadził szeroką dyskusję uzyskanych wyników, a sposób ich interpretacji jest poprawny. Doktorant nie ustrzegł się jednak drobnych błędów i kolokwializmów, stosując bardzo rozbudowane i złożone zdania. Poniżej przytaczam kilka uwag, głównie o charakterze dyskusyjnym, do których proszę aby Doktorant odniósł się podczas obrony.

Uwagi:

- dosyć często Doktorant posługuje się terminem „biokompatybilny materiał”, choć biokompatybilność nie jest cechą samą w sobie a zawsze określeniem układu: gospodarz-gość. Proszę zatem o precyzyjne przedstawienie definicji biokompatybilności, np. w oparciu o pracę prof. Davida F. Williamsa przytoczoną w pracy pt. *„There is no such thing as a biocompatible material”*.

- mówiąc o degradacji powierzchniowej, Doktorant nazywa ten proces degradacją heterogeniczną, choć w literaturze znacznie częściej stosuje się termin „erozja” lub „bioerozja”. Jaka jest zatem różnica pomiędzy erozją powierzchniową a degradacją w masie w odniesieniu do właściwości fizyko-chemicznych polimeru?

- w realizacji badań metodą DSC Doktorant ustalił i zastosował szybkość grzania wynosząca 20 deg/min, choć standardową szybkością jest 10 deg/min. W jakim stopniu szybkość grzania wpływa zatem na temperatury przemian fazowych polimerów?

Ponadto, Doktorant zastosował dla oznaczenia wydłużenia przy zerwaniu symbol A , choć powszechnie, a przede wszystkim w normach, stosuje się l , podczas gdy symbolem A oznacza się pole przekroju próbki (Tabela 1-1).

Podsumowując stwierdzam, że interpretacja uzyskanych wyników jest bardzo wnikliwa i odnosząca się do istniejącego stanu wiedzy, a praca zawiera liczne walory poznawcze.

Wnioski końcowe

Doktorant zrealizował program badań eksperymentalnych zakładający opracowanie nowej metody modyfikacji PHB i PHBV opierającej się na heterogenicznej redukcji biopoliestrów z wykorzystaniem LiBH_4 oraz przeprowadzenie syntez nowych biomateriałów polimerowych dla zastosowań w medycynie regeneracyjnej. Praca wnosi nową wiedzę z zakresu nauk chemicznych, w szczególności dotyczącą opracowanej metody redukcji, która jest pierwszą opisaną w literaturze metodą nie opierającą się na mechanizmach rodnikowych i która umożliwia modyfikację struktury chemicznej powierzchni tak delikatnych wyrobów, jak elektroprzędzone włókna biopoliestrowe. Ponadto przeprowadzenie reakcji z użyciem LiBH_4 , w odróżnieniu od reakcji rodnikowych, nie wpływa negatywnie na szybkość degradacji modyfikowanych wyrobów. Doktorant wykazał również, że zastosowana metoda modyfikacji, przy odpowiednio dobranych parametrach nie wpływa niekorzystnie na przeżywalność komórek *in vitro*, wskazując tym samym na brak cytotoksyczności.

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, stwierdzam iż przedłożona do recenzji praca doktorska mgra inż. Pawła Chabera spełnia wymagania przewidziane ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym (art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. Dz.U. z 2003 r., nr.65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) i rekomenduję przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgra inż. Pawła Chabera do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony.



Szczecin, 6.10.2023 r.