

Prof. dr hab. inż. Maria Rutkowska
Wydział Przedsiębiorczości i Towaroznawstwa
Katedra Chemii i Towaroznawstwa Przemysłowego
Akademia Morska w Gdyni

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Michała Kwietnia
pt. „**Nowe biodegradowalne materiały polimerowe oparte o biopoliestry alifatyczne i ich syntetyczne analogi dla zastosowań w medycynie – synteza i charakterystyka**”

Promotor pracy: Dr hab. Grażyna Adamus, prof. nadzw. PAN

W nowoczesnej medycynie polimery, jako nowy rodzaj materiałów inżynierskich, wypierają w coraz większym stopniu tradycyjne nieorganiczne materiały. Istotne staje się więc ciągle doskonalenie znanych materiałów, w celu uzyskania możliwie optymalnej biotolerancji przez organizmy żywe. Określają to odpowiednie przepisy prawne, dopuszczające wprowadzenie wyrobu do stosowania medycznego.

Biomateriały polimerowe to zarówno polimery naturalne, stosowane od wieków, jak i biostabilne polimery syntetyczne (odporne na działanie środowiska biologicznego) lub celowo biodegradowalne z nietoksycznymi produktami degradacji. Przeznaczone są do współdziałania z systemami biologicznymi i na etapie leczenia graniczą z tkanką pacjenta. Oczekuje się od nich cechy jakościowej, zwanej biokompatybilnością, dzięki której mają możliwość całkowitego scalenia z organizmem, będąc materiałem nietoksycznym i nie mającym szkodliwego wpływu na system biologiczny. Ze względu na szczególne właściwości fizykochemiczne i biologiczne stanowią znakomity materiał jako implanty, nośniki leków i hormonów oraz matryce do zaszczepiania żywych komórek.

Prace badawcze nad systemami długotrwałego kontrolowanego podawania leków to ostatnio najważniejsza dziedzina farmacji. Powolny rozkład polimeru biodegradowalnego poprzez naturalne szlaki metaboliczne kontroluje uwalnianie leku. Materiał polimerowy po spełnieniu swojej roli powinien ulec procesowi degradacji w warunkach organizmu ludzkiego, a produkty degradacji powinny być usunięte, bądź zmetabolizowane przez organizm.

W aplikacjach medycznych stosowane są m. in. biokompatybilne i biodegradowalne poliestry alifatyczne – poli(hydroksyalkaniany). Ich właściwości fizyko-chemiczne są modyfikowane na drodze fizycznej lub chemicznej.

Tematyka recenzowanej pracy wpisuje się w nurt intensywnych badań prowadzonych właśnie nad modyfikacją właściwości wybranych poliestrów na drodze chemicznej.

Pierwszym etapem badań było uzyskanie, w wyniku kontrolowanej degradacji biopoliestrów, reaktywnych makroinicjatorów i makromonomerów o kontrolowanej strukturze chemicznej i masie molowej, które w drugim etapie wykorzystano w syntezie biodegradowalnych i biokompatybilnych materiałów. Nowe biomateriały, zawierające segmenty strukturalne pochodzące od biopoliestrów, wykorzystano do wytworzenia podłoży dla hodowli komórkowych i pokrycia protez naczyń krwionośnych.

Wyzwanie, które zostało podjęte w recenzowanej rozprawie Pana mgr Michała Kwietnia uważam za oryginalne. Praca ma istotny wymiar naukowy i praktyczny.

Uwagi ogólne

Przekazana do recenzji praca doktorska jest bardzo obszerna, liczy 140 stron. Jej struktura, poza wprowadzeniem i wykazem skrótów, obejmuje:

- przegląd literatury,
- cel i zakres pracy,
- omówienie wyników badań,
- podsumowanie i najważniejsze poznawcze wyniki badań,
- część doświadczalną
- wykaz literatury.

Wykaz literatury liczy 245 pozycji (w tym dwie współautorskie pozycje Doktoranta) i zawiera:

- publikacje zwarte,
- artykuły w czasopismach i materiałach konferencyjnych,
- patenty,
- stronę internetową.

Na podstawie cytowanej bogatej literatury, można stwierdzić, że Doktorant zna piśmiennictwo z zakresu prowadzonej działalności naukowej. Szkoda, że Autor, przy omawianiu wyników badań, nie podaje odnośników literaturowych do publikacji własnych, które powstały w oparciu o te badania. Wymienione publikacje nie są także zawarte w wykazie literatury, tylko zamieszczone po określeniu zakresu pracy.

Omówienie pracy

W obszernym przeglądzie literatury interesująco i kompetentnie Doktorant przedstawił zagadnienia, które merytorycznie wiążą się z tematyką pracy doktorskiej, a mianowicie:

- charakterystykę poli(hydroksyalkanianów), będących naturalnymi biopoliestrami,
- metody badań struktury poli(hydroksyalkanianów), ze szczególnym uwzględnieniem spektrometrii mas,
- właściwości poli(hydroksyalkanianów), w tym stabilność termiczną, biodegradowalność i biokompatybilność,
- obszary zastosowań biopoliestrów,
- modyfikacje właściwości fizyko-chemicznych poli(hydroksy-alkanianów) na drodze fizycznej (mieszanki i kompozyty),
- syntezę analogów naturalnych biopoliestrów – poli([R,S]-3-hydroksymaślanu i kopoliestrów.

Przegląd piśmiennictwa stanowi bardzo istotną część pracy doktorskiej. Autor zaprezentował w niej swoją wiedzę, jak i sprawność naukową, która wyraża się w dogłębnej analizie i krytycznym spojrzeniu na wiele zagadnień.

Z doniesień literaturowych wynikało, że na drodze kontrolowanej degradacji poli(hydroksyalkanianów) otrzymuje się oligomery o zdefiniowanych grupach końcowych, które mogą być wykorzystane jako makroinicjatory lub makromonomery w procesach polimeryzacji, dając możliwość modyfikacji właściwości nowych polimerów na etapie syntezy. Chemiczny charakter grup końcowych determinuje ich dalsze wykorzystanie. Kontrolowana degradacja może też prowadzić do obniżenia średniej masy molowej, której efektem jest użyteczny produkt. W ten sposób otrzymuje się różne kopolimery blokowe.

Analiza merytoryczna danych literaturowych pozwoliła Autorowi rozprawy jasno sformułować cel pracy, którym było opracowanie nowych, biokompatybilnych, w pełni biodegradalnych materiałów polimerowych o kontrolowanej strukturze i założonych

właściwościach fizyko-chemicznych, zawierających segmenty strukturalne, pochodzące od biopoliestrów z grupy poli(hydroksyalkanianów).

Czytelnemu celowi pracy został podporządkowany bardzo obszerny zakres pracy, obejmujący opracowanie metod kontrolowanej degradacji biopoliestrów (na drodze selektywnej redukcji i kontrolowanej degradacji), syntezę blokowych poliestrów w oparciu o otrzymane makroinicjatory i wykorzystanie otrzymanych oligoestrodiole w reakcji polikondensacji z dichlorkiem kwasu sebacynowego. Podjęto także próbę wykorzystania nowych materiałów polimerowych w medycynie.

Zakres przeprowadzonych badań stanowi konsekwentną i pełną realizację postawionego celu pracy.

Część doświadczalna pracy, obejmująca opisy zastosowanych w badaniach poliestrów, odczynników chemicznych oraz metod analitycznych – magnetycznego rezonansu jądrowego, spektrometrii mas, chromatografii żelowej, skaningowej kalorymetrii różnicowej, analizy termograwimetrycznej, skaningowej mikroskopii elektronowej – a także syntezę poli[R,S]-3-hydroksymaślanu, redukcji biopoliestrów, degradacji termicznej indukowanej karboksylanami, syntezę kopolimerów blokowych i kondensacji oligoestrodiole z dichlorkiem kwasu sebacynowego oraz otrzymywania podłoża dla hodowli komórkowych, została umieszczona w sposób nietypowy na końcu dysertacji po omówieniu wyników badań. Taki układ pracy pozwolił na wyraźne wpisanie uzyskanych rezultatów badań w aktualne osiągnięcia w zakresie modyfikacji biodegradowalnych poliestrów.

Rozdział: „Omówienie wyników badań” został podzielony trzy części. Przed każdą z części Doktorant umiejętnie nawiązuje do dostępnych danych literaturowych i podejmuje zagadnienia, które uzupełniają i rozwijają nierozwiązane problemy. Szczególnie rozbudowany jest podrozdział „Metody kontrolowanej degradacji wybranych poliestrów alifatycznych”, obejmujący kontrolowaną redukcję syntetycznego poliustru – poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) oraz biopoliestrów – poli(3-hydroksymaślanu-co-4-hydroksymaślanu) i poli(3-hydroksymaślanu-co-3-hydroksyheksanianu) z zastosowaniem borowodorku litu oraz kontrolowaną degradację termiczną poli(3-hydroksymaślanu)-co-4-hydroksymaślanu) indukowaną karboksylanami. Wyniki opracowanej selektywnej kontrolowanej degradacji biopoliestrów na drodze redukcji z zastosowaniem borowodorku litu jako czynnika redukującego wskazują, że średnie masy molowe uzyskanych oligomerów można kontrolować ilością czynnika redukującego. Dogłębna analiza z wykorzystaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego wykazała, że są to liniowe oligoestrodiole, których skład chemiczny jest zbliżony do składu chemicznego biopoliustru użytego do redukcji. Wskazuje to na wysoką selektywność opracowanej kontrolowanej metody redukcji poliestrów.

Strukturę chemiczną oligomerów na poziomie molekularnym zweryfikowano z wykorzystaniem spektrometrii mas z jonizacją metodą elektrorozpylania. Pozwoliło to na identyfikację indywidualnych makrocząsteczek w mieszaninie makrocząsteczek, wchodzących w skład badanych oligomerów, na podstawie określenia struktury chemicznej grup końcowych i rozkładu makrocząsteczek o określonych grupach końcowych. Eksperyment fragmentacyjny, z wykorzystaniem tandemowej spektrometrii mas, potwierdził strukturę indywidualnych makrocząsteczek otrzymanych w wyniku redukcji biopoliestrów.

Przeprowadzona dogłębna analiza widm dała bardzo precyzyjną informację o strukturze produktów redukcji biopoliestrów – oligoestrodiole, zawierających terminalne pierwszo- i drugorzędowe grupy hydroksylowe wytworzone w wyniku statystycznej redukcji grup estrowych poliustru.

Badania degradacji termicznej biopoliustru, zawierającego w swej strukturze jednostki konstytucyjne 4-hydroksymaślanowe, dotyczyły wpływu octanu potasu, jako czynnika indukującego degradację na stabilność termiczną.

Autor stwierdził, że wprowadzenie soli karboksylowej do środowiska reakcji umożliwiło prowadzenie degradacji kopolimeru w znacznie niższej temperaturze niż temperatura pirolizy.

Analiza widm jądrowego rezonansu magnetycznego nietlotnych produktów degradacji termicznej kopolimeru indukowanej karboksylanami wykazała, że są to liniowe oligomery zakończone krotonianowymi i karboksylanowymi grupami końcowymi.

W kolejnym etapie badań z wykorzystaniem spektrometrii mas dla rozróżnienia liniowych i cyklicznych oligomerów przeprowadzono selektywną reakcję chemiczną (estryfikację trimetylosililodiazometanem) z liniowymi oligomerami zawierającymi grupę karboksylową. Obecnie w układzie oligomery cykliczne w warunkach procesu derywatywacji nie uległy reakcji estryfikacji, a analiza widm masowych produktów wykazała, że w wyniku degradacji pirolitycznej otrzymano mieszaninę oligomerów cyklicznych i liniowych. Natomiast degradacja termiczna, indukowana karboksylanem, doprowadziła do otrzymania jednorodnych oligomerów liniowych.

Następny rozdział pracy dotyczył syntezy nowych materiałów polimerowych, zawierających segmenty strukturalne, pochodzące od biopoliestrów.

Autor dysertacji podjął próbę modyfikacji właściwości biopoliestrów poprzez syntezę nowych kopolimerów na drodze polikondensacji oligoestrodiole o zróżnicowanych średnich masach molowych (z biopoliestru poli(3-hydroksymaślanu-co-3-hydroksyheksanianu) z dichlorkiem kwasu sebacynowego.

Otrzymano terpoliestry zawierające trzy rodzaje jednostek konstytucyjnych: 3-hydroksymaślanowe, 3-hydroksyheksanianowe oraz pochodzące od kwasu sebacynowego. Dla potwierdzenia ich składu molowego i struktury posłużono się techniką magnetycznego rezonansu jądrowego. Terpoliestry charakteryzowały się wyższą stabilnością termiczną niż wyjściowy biopoliester. Wprowadzenie jednostek kwasu sebacynowego do łańcucha poliesterowego wpłynęło na zwiększenie elastyczności materiału oraz obniżenie temperatury przetwórstwa. Wymaga to jednak wyjaśnienia.

Mając na uwadze, że β -butyrolakton ulega polimeryzacji wobec aktywnych karboksylanów lub makroinicjatorów, uzyskanych na drodze kontrolowanej zasadowej hydrolizy biopoliestrów zbudowanych z jednostek konstytucyjnych β -hydroksykwasów, Doktorant przeprowadził syntezę kopolimerów blokowych w oparciu o makroinicjatory poli(hydroksyalkanianu) zakończone krotonianowymi i karboksylanowymi grupami końcowymi. Kopolimery blokowe, zawierające w swej strukturze bloki ataktyczne poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) i izotaktyczne bloki poli(3-hydroksymaślanu-co-4-hydroksymaślanu), charakteryzowały się zróżnicowaną masą molową. Technika jądrowego rezonansu magnetycznego potwierdziła ich strukturę chemiczną.

Kopolimery blokowe posiadały właściwości termiczne pośrednie pomiędzy izotaktycznymi biopoliestrami a syntetycznym poli([R,S]-3-hydroksymaślanem).

Wprowadzenie bloków poli([R,S]-3-hydroksymaślanu do kopolimeru powoduje szybszą degradację kopolimeru blokowego niż poli(hydroksyalkanianów) o podobnej masie molowej. Degradacja hydrolityczna blokowych poliesterów zachodzi bowiem w sposób uprzywilejowany w obszarach amorficznych o mniejszym uporządkowaniu, a więc w blokach poli([R,S]-3-hydroksymaślanu).

Uzyskane w wyniku syntezy terpoliestry zostały wstępnie przebadane w aspekcie zastosowania w nowej gałęzi medycyny – w medycynie regeneracyjnej, jako rusztowania do hodowli komórkowych, a kopolimery blokowe, zawierające bloki izotaktycznego biopoliestru i ataktycznego syntetycznego poli([R,S]-3-hydroksymaślanu) – jako biodegradowalne, hemokompatybilne i wytrzymałe powłoki polimerowe do pokrywania protezy serca, wykonanej z biomimetycznego poliuretanu lub do uszczelniania protez naczyń krwionośnych

z włókien poliestrowych. Przeprowadzone eksperymenty wskazują na zasadność tych zastosowań.

Konieczne jest jednak przeprowadzenie szczegółowych badań biologicznych. Materiał polimerowy, umieszczony w organizmie żywym, ma kontakt z komórkami krwi. Hemokompatybilność jest więc podstawowym warunkiem, kwalifikującym materiał do dalszych badań nad bezpiecznym użytkowaniem do celów medycznych, a więc należałoby przede wszystkim określić wpływ nowego polimeru na parametry pełnej krwi ludzkiej – białokrwinkowe i czerwokrówinkowe, płytki krwi oraz czas kaolinowo-kefalinowy.

Uwagi formalne

Praca przygotowana jest starannie pod względem stylistycznym i graficznym z wyjątkiem licznych błędów interpunkcji.

Natomiast tytuł rozprawy zawiera niefortunne sformułowanie „materiały polimerowe oparte o biopoliestry”.

Moje zastrzeżenie budzi sposób przedstawienia w formie „monolitu” ważnych dla rozprawy wyników badań w rozdziale 4.3., dotyczących zastosowań kopolimerów blokowych i terpoliestrów w obszarze medycyny. Nie pozwoliło to, na czytelną prezentację i dokładną analizę rezultatów uzyskanych w obszarach:

- właściwości fizyczne,
- wpływ na fibroblasty,
- inkubacja w płynach fizjologicznych,
- przesiąkliwość protez.

Wyjaśnienia wymaga informacja ze str. 113 „średnia liczba martwych fibroblastów ...wynosiła $13,00 \pm 2,00$ komórek”. Jaka była całkowita ilość fibroblastów?

Na str. 114 Autor podaje, że „analiza sztucznego osocza, w którym w temperaturze 37°C przez 30 dni inkubowano krążki poliestrowe pokryte badanymi powłokami ...nie wykazała obecności sygnałów odpowiadającym uwalnianym z powłok produktom degradacji...”. Brak jest informacji, dlaczego badanie trwało 30 dni? Czy to wystarczający czas na wzrost komórek i regenerację tkanki?

W spisie literatury nie podano tytułów cytowanych książek.

Przedstawione uwagi formalne mają jednak charakter drugorzędny i nie kwestionują wyników rozprawy.

Ocena

W moim przekonaniu recenzowana rozprawa spełnia wszystkie wymagania ustawy o stopniach i tytule naukowym. Autor zawarł w pracy elementy nowatorskie, w tym:

- opracowanie metod kontrolowanej degradacji biopoliestrów, pozwalających na otrzymanie reaktywnych makroinicjatorów i makromonomerów:
 - selektywnej redukcji z zastosowaniem borowodorku litu, jako czynnika redukującego, w celu uzyskania oligoestrodiole,
 - degradacji termicznej biopoliestru indukowanej karboksylanami, która pozwala uzyskać liniowe oligomery z krotonianowymi i karboksylowymi grupami końcowymi,
- syntezy nowych materiałów polimerowych o kontrolowanej strukturze molekularnej, zawierających segmenty strukturalne, pochodzące od biopoliestrów, na drodze:

- polikondensacji oligoestrodiole z poli(3-hydroksymaślanu-co-3-hydroksyheksanianu) z dichlorkiem kwasu sebacynowego w celu otrzymania terpoliesterów,
- anionowej polimeryzacji β -butyrolaktone z wykorzystaniem makroinicjatorów, zakończonych grupami krotonianowymi i karboksylowymi, otrzymanych w wyniku degradacji termicznej poli(3-hydroksymaślanu-co-4-hydroksymaślanu), prowadzącej do uzyskania kopolimerów blokowych, zawierających bloki pochodzące od izotaktycznego biopoliestru i od ataktycznego poli([R,S]-3-hydroksymaślanu).

Spełnione zostały wymagania merytoryczne:

- aktualność podjętego tematu,
- trafność celu rozprawy
- szczegółowe motywacje badań,
- spełnienie wymogów nowatorskich,
- poprawność merytoryczna,
- poprawność metodologiczna.

Doktorant wykazał dobrą znajomość literatury w zakresie podjętego tematu badań i nowoczesnych technik analitycznych oraz umiejętność przeprowadzenia pracy badawczej i prawidłowego wnioskowania na podstawie bardzo bogatego materiału doświadczalnego.

Wniosek

Oceniając wysoko pracę dysercyjną Pana mgra inż. Michała Kwietnia wnioskuję o wyróżnienie i dopuszczenie Autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

