POLITECHNIKA
GDAŃSKA
WYDZIAŁ CHEMICZNY
Katedra Technologii Polimerów
Prof. dr hab. inż. Józef T. Haponiuk

Gdańsk, 28 września 2023 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Pawła Jakuba Piszko

pt.

Materiały kompozytowe na bazie poli(sebacynianu gliceryny) do potencjalnego wykorzystania w inżynierii tkankowej kości.

wykonanej pod kierunkiem promotora dr hab. inż. Konrada Szustakiewicza, prof. PWr
oraz promotor pomocniczej dr Karoliny Rudnickiej
w Katedrze Inżynierii i Technologii Polimerów Politechniki Wrocławskiej

WPROWADZENIE

Poli(sebacynian gliceryny) (PGS) może być stosowany jako rusztowanie (skafold) w inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej, gdyż oferuje szereg użytecznych właściwości, jak biokompatybilność, biodegradowalność i właściwości elastomerowe. Dzięki temu jest szczególnie przydatny do inżynierii tkanek, które muszą być wytrzymałe mechanicznie i elastyczne, takich jak tkanka serca lub tkanka mięśniowa. Właściwości mechaniczne i szybkość degradacji PGS można regulować, modyfikując parametry jego syntezy. Umożliwia to badaczom dostosowanie skafoldów na bazie PGS do specyficznych wymagań aplikacji.

PGS można przetwarzać różnymi metodami, takimi jak elektroprzędzenie, odlewanie rozpuszczalnikowe i druk 3D, w zależności od pożądanej struktury rusztowania i zastosowania. Biorąc pod uwagę te właściwości, PGS i jego kompozyty są obiecującymi biomateriałami w różnych zastosowaniach inżynierii tkankowej, w tym między innymi w regeneracji skóry, inżynierii tkanek sercowo-naczyniowych, naprawie tkanek miękkich i tkanek kostnych.

Rozprawa doktorska mgr inż. Pawła Piszko, zawierająca bogatą dokumentację badań właściwości fizykochemicznych i biologicznych otrzymanych biomateriałów ma szansę przysłużyć się szybszemu wprowadzeniu skafoldów kompozytowych na bazie poli(sebacynianu gliceryny) i hydroksyapatytu do praktyki klinicznej.

CHARAKTERYSTYKA OCENIANEJ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Rozprawa doktorska Pawła Jakuba Piszko powiązana jest z realizacją projektu TEAM-NET Fundacji na rzecz Nauki Polskiej pt. Wielofunkcyjne kompozyty aktywne biologicznie do zastosowań w medycynie regeneracyjnej układu kostnego".

Rozprawa ta została przedstawiona na 150 stronach o formacie A4 z zachowaniem podziału na część literaturową (20 stron), część doświadczalną (82 strony), podsumowanie i wnioski. Spis literatury obejmuje 214 pozycji przedstawiających dobrze dobrane, aktualne artykuły naukowe. Kolejną częścią jest wykaz dorobku naukowego, który obejmuje 6 pozycji wieloautorskich, przy czym w 4 pracach P. Piszko jest pierwszym autorem, wykaz 5 zgłoszeń patentowych, wykaz udziału w projektach, wykaz wybranych wystąpień na konferencjach naukowych, wykaz wybranych rozdziałów w monografiach konferencyjnych (7 pozycji), informacje o współautorstwie rozdziału w książce popularnonaukowej nie powiązanej z tematyką rozprawy oraz informacje o stażach i szkoleniu w uniwersytecie w Padwie. Pracę zamykają wykazy rysunków i tabel oraz glosariusz skrótów wykorzystanych w pracy.

OMÓWIENIE CZĘŚCI LITERATUROWEJ

W części literaturowej przedstawione są informacje dotyczące początków i rozwoju badań nad poli(sebacynianem gliceryny) jako biomateriałem. Autor szczegółowo omawia zależności pomiędzy metodami syntezy PGS a jego właściwościami, wynikającymi głównie ze stopnia usieciowania. W rozdziale dotyczącym otrzymywania porowatych skafoldów przedstawia najważniejszą technikę - indykowaną termicznie separację fazową (TIPS), którą zastosował w pracach eksperymentalnych. Omawia również alternatywne metody formowania PGS – elektroprzędzenie i druk 3D. W kolejnym rozdziale omawia metody syntezy i wykorzystanie hydroksyapatytu w inżynierii tkankowej.

Rozdział 1.5 nosi nazwę „Wykorzystanie układów zawierających PGS" . Czy Autorowi jest znane rutynowe, kliniczne wykorzystanie takich układów, czy też jest to tylko wykorzystanie do badań? Wykorzystanie PGS w pracach badawczych z dziedziny inżynierii tkankowej jest omówione najbardziej szczegółowo, jako temat najbliższy do celu i założeń pracy. Zakres, szczegółowość i aktualność informacji przedstawionych w części literaturowej oceniam bardzo dobrze.

Zauważone błędy w części literaturowej dotyczą powiązania wytrzymałości na rozciąganie z wymiarami próbki:

Str.17 „Z kolei wytrzymałość na rozciąganie PGS jest *równa nawet 3-krotności wymiarów próbki [3]*" . W przywoływanym artykule ("Poly(glycerol sebacate) biomaterial: synthesis and

biomedical applications." doi:10.1039/c5tb01048a) znajdujemy: The ultimate tensile strength (UTS) of the polymer lies in the range between 0.4 and 0.7 MPa. And its *maximal elongation is 1.2 to 3 times its original length.*

Str 17: Ponownie warto nadmienić, że jest ona (wytrzymałość na rozciąganie) ściśle zależna od formy materiału (np. lity/porowaty) *oraz jego wymiarów* i składu.

OMÓWIENIE CZĘŚCI DOŚWIADCZALNEJ

Część doswiadczalna rozpoczyna się od dokładnego przedstawienia syntezy hydroksyapatytu stosowanego w pracy do otrzymywania biokompozytu z PGS.

Drugi składnik opracowanego biokompozytu, PGS, został otrzymany techniką prepolimerową poprzez polikondensację temperaturową lub przez syntezę katalizowaną enzymatycznie.

Skafoldy porowate oraz kompozytowe z hydroksyapatytem otrzymywano techniką indukowanej termicznie separacji fazowej z sieciowaniem termicznym oraz z wymywaniem soli.

Próbki charakteryzowano przez pomiary kąta zwilżania, pomiary gęstości względnej i porowatości, pomiary stopnia usieciowania w rozumieniu zawartości frakcji usieciowanej, pomiary techniką ^{1}H NMR, pomiary techniką ATR-FTIR, pomiary technika DSC, pomiary stabilności termicznej techniką TGA, badania techniką mokrotomografii, badania metodą SEM, badania metodą stereoskopowej mikroskopii optycznej, pomiary wytrzymałości na ściskanie, pomiary gęstości usieciowania na podstawie statycznych testów rozciągania oraz pomiary metodą DMA.

Badano inkubację skafoldów w standardowych buforach fizjologicznych i efekty oceniano na podstawie zmian pH, przewodnictwa i pęcznienia równowagowego. Badania biologiczne in vitro wykonano w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego z udziałem Autora. Przeprowadzono ocenę cytozgodności biomateriałów z wykorzystaniem odpowiednich procedur i zalecanych linii komórkowych,

Potencjał osteokondukcyjny skafoldów kompozytowych PGS/HAp i skafoldów z czystego PGS badano względem ludzkich preosteoblastów linii hFOB 1.19 . przeprowadzono ocenę proliferacji osteoblastów, ocenę aktywności fosfatazy alkalicznej i ocenę profilu uwalnianych cytokin.

Wykonane badania zostały wykonano prawidłowo, analogicznie do metod opisanych w literaturze. Przedstawione analizy i wnioski znajdują uzasadnienie w wynikach badań wykonanych przez Autora, które zostały w większości opublikowane.

Najważniejsze rezultaty rozprawy doktorskiej mgr inż. Pawła Piszko to wyniki badań biologicznych wykonanych *in vitro* dla pianek PGS i kompozytów PGS/HAp o różnej zawartości hydroksyapatytu, zaprezentowane wyczerpujaco na 10 stronach rozprawy w odniesieniu do cytokompatybilności, właściwości osteokondukcyjnych charakteryzowanych przez proliferację osteoblastów, stężenie markerów kościotworzenia i stężenie cytokin pro- i przeciwzapalnych. W odniesieniu do kompozytów PGS/HAp została potwierdzona ich aktywność osteokonduktywna w odniesieniu do stymulowania osteoblastów ludzkich do różnicowania przy zadawalających właściwościach mechanicznych i fizykochemicznych. Wyniki te kwalifikują opracowanych skafoldy kompozytowe typu PGS/HAp do dalszych badań w warunkach *in vivo* dla uzyskania potwierdzenia możliwości efektywnego i bezpiecznego stosowania tego biomateriału w inżynierii tkanek kostnych.

UWAGI DYSKUSYJNE

1. Co oznacza termin upakowanie makromolekuł w przestrzeni reakcyjnej (str. 12)?
2. Czy jest możliwe wstrzymywanie reakcji co 10 sekund (str. 14)?
3. Do wyliczenia gęstości usieciowania wykorzystano zależność pomiędzy modułem sprężystości a liczbą moli aktywnych łańcuchów pomiędzy punktami usieciowań w jednostce objętości przedstawiona w równaniu (3), które stosuje się dla idealnych sieci polimerowych (ideal rubber) i bywa, że jest bezkrytycznie używane. Wyliczona w ten sposób gęstość usieciowania obejmuje zarówno węzły sieci utworzone przez łańcuchy polimerowe połączone wiązaniami chemicznymi, jak i zapętlenia. Bazując na tym równaniu, gęstość usieciowania możemy wyliczyć dla każdego polimeru, w tym stuprocentowo liniowego, gdyż zawsze zmierzymy moduł Younga. Badane materiały wykazywały stopień usieciowania w zakresie 81,5 – 97,5% (Tabela 10). Dla materiałów posiadających frakcję nieusieciowaną, więc rozpuszczalną, gęstość usieciowania powinna być badana po ekstrakcji frakcji nieusieciowanej.
4. Spektroskopia NMR nie jest techniką zalecaną dla pomiaru mas cząsteczkowych polimerów, chyba, że badane są oligomery ze zdefiniowanymi grupami końcowymi. Czy nie było możliwości pomiarów metoda SEC? Jaka jest dokładność wyników zaprezentowanych w tabelach 2, 3, 4, 5 (str 56-60)?
5. Str 72: „Temperatura degradacji Td była wyznaczana w miejscu punktu przegięcia krzywej z wykresu DTG". Na wykresie DTG mamy w tym miejscu maksimum piku i jest to temperatura największej szybkości degradacji, a nie temperatura degradacji, która rozpoczyna się w znacznie niższych temperaturach.

6. W zastosowaniu biomateriału w inżynierii tkankowej kości można by oczekiwać, że nie jest korzystne stosowanie biokompozytu wykazującego właściwości elastomerowe, typowe dla materiałów mniej sztywnych. Czy jest tak rzeczywiście?
7. Doktorant jest pierwszym autorem artykułu "PGS/HAp Microporous Composite Scaffold Obtained in the TIPS-TCL-SL Method: An Innovation for Bone Tissue Engineering", Int. J. Mol. Sci. 2021, 22(16), 587; https://doi.org/10.3390/ijms22168587, w którym przedstawione są między innymi wyniki badań in vivo otrzymanych skafoldów. Dlaczego wyniki tych badań nie są omówione w rozprawie, a implamentacja opracowanego materiału do badań in vivo jest traktowana jedynie jako możliwość (Wnioski, str 117) ?

UWAGI EDYTORSKIE

Rysunek 13 jest identyczny jak analogiczny rysunek w cytowanej obok niego ważnej pozycji literaturowej [13], gdzie tylko nie ma legendy „Wyróżnione substruktury". Proszę o komentarz, czy jest to wynik własny, czy cytat.

W polskiej literaturze stosowane są terminy : rusztowania tkankowe, rusztowania komórkowe i skafoldy (na przykład: Inżynieria Biomateriałów 118 (2013) 12-17). Te terminy są lepsze niż używana w rozprawie nazwa pisana kursywą: *scaffoldy*.

Pozycje literaturowe nie są numerowane w tekście ściśle według kolejności. Spis literatury jest bardziej pomocny, jeśli zawiera pełne tytuły artykułów i numery DOI.

Obecnie nie stosuje się nazwy DMTA wprowadzonej dawniej przez firmę Polymer Laboratories. DMA jest poprawnym skrótem dla analizy termicznej dynamicznych właściwości mechanicznych.

Zauważone drobne pomyłki:

Str 14: możliwe jest przeprowadzenie sieciowania chemiczne / Str.20: mat zwierających PGS / Str. 32: synteza była przeprowadzona na reaktorze /Str. 42: pomiary wykonane na pH-metrze Str. 45 i nie tylko: r-rem zamiast roztworem, nie ma takiego skrótu / Str. 83: Pomimo iż, nie możemy (przecinek ma być przed iż) / Str 85: *tltimate tensile* /Str. 149: diizocyjanianem (ma być: diizocyjanian) / Str. 150: kopolimeru (ma być: kopolimer)

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRZEDSTAWIONEJ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Pawła Jakuba Piszko, zgodnie z kryteriami wyróżniania prac doktorskich w dyscyplinie inzynieria chemiczna w Politechnice Wrocławskiej. Mój wniosek uzasadniam jej wysoką wartością naukową i przedstawieniem rozprawy w sześciu pracach, opublikowanych w uznanych czasopismach o wysokiej punktacji MeiN (w tym dwukrotnie 140 pkt i również dwukrotnie 100 pkt.), a szczególnie w publikacji, w której jest pierwszym i korespondencyjnym autorem:
„PGS/HAp Microporous Composite Scaffold Obtained in the TIPS-TCL-SL Method: An Innovation for Bone Tissue Engineering", Int. J. Mol. Sci. 2021, 22(16), 587; https://doi.org/10.3390/ijms22168587 , która była cytowana 12 razy wg. Web of Science i do dnia 28 września 2023 była otwierana 3232 razy na stronie wydawcy).

Prace przeglądowe z tematyki doktoratu, opublikowane z wiodącym udziałem Doktoranta uważam również za bardzo wartościowe („Review on polymer, ceramic and composite materials for cad/cam indirect restorations in dentistry—application, mechanical characteristics and comparison", Skorulska, A., Piszko, P., Rybak, Z., Szymonowicz, M., Dobrzyński, M. 2021, 14(7), 1592; 52 cytowań wg. Scopus oraz Piszko P, Kryszak B, Piszko A, Szustakiewicz K. „Brief review on poly(glycerol sebacate) as an emerging polyester in biomedical application: Structure, properties and modifications." Polim Med. 2021;51(1):43–50. doi:10.17219/pim/139585; 14 cytowań wg. Scopus).

Istotnym osiągnięciem mgr inż. Pawła Jakuba Piszko jest współautorstwo sześciu zgłoszeń patentowych opracowanych na podstawie wyników prac przeprowadzonych w ramach jego pracy doktorskiej i w ramach zrealizowanego projektu TEAM-NET.

WNIOSEK KOŃCOWY

Stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity w Dz. U. 2017 poz. 1789 wraz z późniejszymi zmianami) i zwracam się do Rady Dyscypliny Naukowej Inżynieria Chemiczna Politechniki Wrocławskiej o przyjęcie pracy doktorskiej i dopuszczenie mgr inż. Pawła Jakuba Piszko do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.