



Politechnika Łódzka

Instytut Technologii Polimerów i Barwników

Łódź, 26.07.2022

Prof. dr hab. inż. Krzysztof Strzelec

Instytut Technologii Polimerów i Barwników

Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej

ul. Stefanowskiego 16

90-537 Łódź

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Michała Grzymajło

pt. *”Materiały kompozytowe z poli(adypinianu glicerolu) oraz bioszklą o potencjalnym zastosowaniu do odbudowy tkanki kostnej”*

Recenzja została przygotowana na podstawie Uchwały nr 195/26/RDND05/2021-2024 Rady Dyscypliny Naukowej Inżynieria Chemiczna Politechniki Wrocławskiej z dnia 06.07.2022.

Przedłożona do recenzji praca doktorska mgr inż. Michała Grzymajło została wykonana w Katedrze Inżynierii i Technologii Polimerów Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Określony w tytule temat pracy dotyczący badań nad opracowaniem metody otrzymywania oraz charakterystyką właściwości niecytotoksycznych kompozytów z poli(adypinianu glicerolu) oraz bioszklą, mieści się w szerokim programie badań, jakie prowadzi od szeregu lat jej promotor dr hab. inż. Konrad Szustakiewicz, prof. uczelni. Jego zespół znany z szeregu ważnych dokonań zarówno w badaniach podstawowych jak i pracach aplikacyjnych w zakresie syntezy nowych kompozytów polimerowych i biomateriałów. Niniejsza praca została wykonana w ramach multidyscyplinarnego projektu *”Wielofunkcyjny materiał kompozytowy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych i pro-regeneracyjnych do odbudowy tkanki kostnej”*

90-537 Łódź, ul. Stefanowskiego 16
tel. (+48 42) 631 32 10
e-mail: polbarw@info.p.lodz.pl, <http://polimbarw.p.lodz.pl>
REGON 000001583, NIP 727-002-18-95



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

(TECHMATSTRATEG2/406384/7/NCBR/2019, realizowanego w konkursie NCBiR Techmatstrateg 2 przez konsorcjum składające się z: Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie, Politechniki Wrocławskiej, Uniwersytetu Gdańskiego, Instytutu Biotechnologii i Medycyny Molekularnej w Gdańsku oraz firmy SensDx SA z Gdańska. Praca zawiera bardzo bogaty materiał doświadczalny a jej wnioski końcowe są całkowicie przekonujące, co stanowi niewątpliwy sukces Autora, gdyż przeprowadzenie tak dużej liczby eksperymentów i pomiarów, wymagało niewątpliwie dużej systematyczności i starannego zaplanowania badań z wykorzystaniem wielu technik eksperymentalnych i pomiarowych.

Obserwowany w ostatnich latach intensywny postęp cywilizacyjny, niesie za sobą istotną potrzebę opracowywania nowych materiałów, dedykowanych do różnorodnych zastosowań na każdej niemal płaszczyźnie życia codziennego. Obok postępu technicznego w obrębie takich podstawowych dziedzin nauki i techniki jak: przemysł motoryzacyjny i lotniczy, elektronika, optyka, automatyka i robotyka, obserwuje się także gwałtowny rozwój inżynierii materiałowej w obszarze materiałów funkcjonalnych dla potrzeb medycyny. Materiały takie w przeciwieństwie do innych zastosowań, wymagają bardziej specyficznych i niezwykle precyzyjnie dobranych właściwości. Dyscypliną naukową stwarzającą zapotrzebowanie na takie nowoczesne rozwiązania i materiały jest inżynieria tkankowa, której głównym celem jest otrzymanie materiału biologicznego, umożliwiającego zastąpienie lub przywrócenie podstawowych funkcji uszkodzonych tkanek. Recenzowana praca dotyczy jednego z głównych osiągnięć inżynierii tkankowej tj. rusztowań (skafoldów), stanowiących podłoże dla wzrostu komórek. Są one w większości mikroporowatymi strukturami, tak zaprojektowanymi, aby zasiedlone na nich komórki miały możliwość tworzenia trójwymiarowych struktur tkankowych, zapewniając im warunki możliwie jak najbardziej zbliżone do tych, które naturalnie występują w organizmie, co w znaczący sposób przyspiesza regenerację uszkodzonych tkanek. W przypadku tkanek twardych np. tkanki kostnej, materiałami stosowanymi do wytwarzania rusztowań komórkowych mogą być z uwagi na dobrą wytrzymałość mechaniczną, metale, szkło oraz ceramika. Coraz większe zainteresowanie wielu światowych ośrodków badawczych skupia się także na skafoldach otrzymywanych z polimerów, a w szczególności polimerów biodegradowalnych o kontrolowanym czasie biodegradacji. Ich zaletą jest kontrolowany rozkład w organizmie do nietoksycznych i łatwo wydalanych produktów, dzięki czemu nie ma potrzeby usuwania implantów z organizmu pacjenta.

Podjęta przez Doktoranta tematyka wykorzystania skafoldów kompozytowych jest więc bardzo aktualna i ważna oraz doskonale wpisuje się w trendy światowe. Uważa się, iż inżynieria tkankowa jest przyszłością medycyny regeneracyjnej i pozwoli na zastępowanie takich metod jak transplantacje czy protezy, znosząc niektóre ograniczenia wynikające z ich stosowania, jak np. ryzyko odrzucenia przeszczepu czy brak integracji z naturalną tkanką. Zaprezentowane w pracy doktorskiej mgr inż. Michała Grzymajło, wyniki badań nad optymalizacją procesu otrzymywania kompozytu z matrycą z bioresorbowalnego poli(adypinianu glicerolu) napełnionego bioszkiełem, wnoszą do tematyki szereg cennych, niepodejmowanych dotychczas rozwiązań i analiz, które na pewno znajdą szybkie zastosowanie w projektowaniu nowych, czy też modyfikacji obecnych już na rynku materiałów.

Nadrzędnym celem pracy było opracowanie metody syntezy poli(adypinianu glicerolu) PGA, charakterystyka materiału przed i po sieciowaniu termicznym oraz chemicznym, zaproponowanie procedury formowania tego polimeru w postaci litej i porowatej, jak również przygotowanie finalnego materiału tj. kompozytu z dodatkiem bioszkieła. Przeprowadzone badania obejmowały szeroką charakterystykę właściwości materiałów, obejmującą właściwości fizykochemiczne, mechaniczne, reologiczne oraz biologiczne.

Dobrze zaplanowana strategia przeprowadzonych badań obejmowała następujące etapy:

- Otrzymywanie poli(adypinianu glicerolu) o liniowej strukturze na drodze polimeryzacji enzymatycznej adypinianu diwinylu i glicerolu z wykorzystaniem lipazy.
- Sieciowanie termiczne PGA.
- Sieciowanie chemiczne PGA z użyciem [REDACTED]
- Wytwarzanie i charakterystyka kompozytów PGA/bioszkieło.
- Optymalizacja procesów otrzymywania skafoldów PGA oraz PGA/bioszkieło i charakterystyka ich właściwości obejmująca badania wytrzymałościowe oraz określenie struktury morfologicznej.
- Testy cytotoksyczności próbek PGA i kompozytów oraz wstępne badania cytokompatybilności materiału z wykorzystaniem [REDACTED]

Aby uniknąć zamieszczania kolejnego streszczenia pracy, chciałbym bezpośrednio przejść do oceny rozprawy i omówienia sposobu rozwiązywania przez Autora najważniejszych zagadnień stanowiących o celu realizacji pracy. Rozprawa napisana została zwięźle, obejmuje 120 stron druku. Doktorant zaprezentował w niej 23 tabele i 39 rysunków. Układ pracy nie budzi zastrzeżeń i odpowiada ogólnie przyjętemu schematowi opisu pracy. Otwiera ją krótkie, dwustronicowe *Wprowadzenie* oraz *Rozdział 1. Cele Pracy*, w którym jedynie hasłowo zaprezentowano trzy najważniejsze zadania jakie postawił sobie Autor. W rozprawie zabrakło sformułowania wyodrębnionej tezy pracy, która mogłaby być zastąpiona bardziej precyzyjnie określonymi celami cząstkowymi, których także brakuje, choć należą one do standardowego elementu większości prac doktorskich.

Przedstawione przez mgr inż. Michała Grzymajło elementy pracy są poprawnie ułożone i oznaczone, umożliwiając czytelnikowi właściwą orientację, pomimo obszernego materiału badawczego w niej zawartego. Chciałbym w tym miejscu wyraźnie podkreślić, że recenzowana dysertacja zasługuje na słowa pochwały, jest ona estetycznie zredagowana, a każdy element szczegółowo dopracowany.

W 24-stronnicowym przeglądzie literatury przedmiotowej, Autor omawia szeroko zagadnienia związane z syntezą, przetwórstwem i zastosowaniem poliestrów alifatycznych, szczególnie w medycynie. Istotnymi dla tematyki pracy elementem przeglądu literatury, są rozdziały poświęcone zastosowaniu ceramiki w inżynierii tkankowej, z uwzględnieniem najważniejszych obecnie komercyjnych bioszkieł. Szkoda jedynie, że Autor nie wyodrębnił w tej części pracy, osobnego podrozdziału dotyczącego zastosowania bioszkieł, jak również innych napełniaczy i nanonapełniaczy kompozytów polimerowych stosowanych do wytwarzania implantów. Liczba zacytowanych pozycji literaturowych (154) świadczy o dużym zainteresowaniu materiałami będącymi przedmiotem badań i jest dowodem na to, że Doktorant podjął się tematyki bardzo aktualnej i pożądanej w środowisku naukowym. Cytowane, aktualne pozycje literaturowe, ilustrujące omawiane zagadnienia pochodzą z różnych źródeł, a więc nie mają charakteru wybiórczego. Również w dalszych częściach swojej pracy Autor bardzo często dokonuje korelacji wyników swoich badań z danymi literaturowymi. Za szczególnie wartościową część przeglądu literatury, dzięki której może ona stanowić użyteczny materiał dydaktyczny, należy uznać rozdział dotyczący syntezy i przetwórstwa poliestrów alifatycznych i otrzymywanych na ich bazie kompozytów. Przegląd literatury sporządzony został bardzo skrupulatnie i kompetentnie, o czym niech świadczy np. wskazanie zbieżności nomenklatury dla skrótu PGA stosowanego zarówno dla poli(kwasu glikolowego) jak i poli(adypinianu glicerolu).

W kolejnej części pracy zatytułowanej *Część doświadczalna*, Autor przedstawił opis metodyki badawczej oraz procedur przeprowadzonych syntez, zastosowanych odczynników, jak również przedstawił zastosowane techniki eksperymentalne, metody analizy i charakterystyki fizykochemicznej otrzymanych materiałów. Część ta jest napisana precyzyjnie i klarownie, w sposób pozwalający na łatwe i systematyczne śledzenie przebiegu pracy eksperymentalnej, a co najważniejsze na powtórzenie określonych badań przez innych badaczy. Część doświadczalna pracy została przedstawiona na 19 stronach, w sposób jasny, wystarczająco zwięzły, napisana dobrym językiem pozbawionym żargonu laboratoryjnego.

Opis badań własnych Doktoranta wraz z uzyskanymi wynikami, przedstawiony jest w Rozdziale 5 *Wyniki i dyskusja*, podzielonym na 12 podrozdziałów i stanowi główną część pracy. Systematyczne przedstawienie w tym rozdziale wyników pracy wraz z odniesieniami do literatury, uważam za bardzo istotny i pożyteczny element opisu pracy. Świadczy on dobrze o umiejętności krytycznego spojrzenia przez Doktoranta na rezultaty swoich badań na tle doniesień literaturowych.

Z obowiązku recenzenta pragnę wskazać nieliczne, co wyraźnie zaznaczam, niedociągnięcia czy też elementy wymagające dyskusji:

1. W Rozdziale 5.1.1 przedstawiono wyniki badań termogravimetrycznych dla oceny stabilności termicznej. Pokrywający się przebieg krzywych termogravimetrycznych, szczególnie w zakresie wyższych temperatur, powyżej 300 °C, jest standardowo obserwowany dla większości poliestrów alifatycznych. Jednakże, czy dla obserwowanych w obszarze 100-300 °C, różnic w termogramach dla próbek syntezowanych w odmiennych temperaturach, przyczyn nie należałoby szukać w ulatnianiu się związków małowcząsteczkowych (np. wody), czy też usuwaniu produktów termosieciowania? Sądzę, że jedynie zastosowanie metod sprzężonych (np. TG/MS lub TG/FT-IR), pozwoliłoby na precyzyjne określenie przyczyn odmiennego mechanizmu degradacji dla tych próbek.
2. Nie jest oczywiście rolą recenzenta pouczanie Autora w kwestii rodzaju podjętych badań, jednak nie mogę oprzeć się pokusie zadania pytania, dlaczego w pracy nie podjęto próby odpowiedzi na pytanie, na ile otrzymane kompozyty PGA/bioszkle zachowują wysoką biogodność napełniacza tj. bioszkle? Te stosunkowo

nieskomplikowane badania polegają na długotrwałym inkubowaniu próbek w Symulowanym Płynie Ustrojowym (*SBF – Simulated Body Fluid*) i obserwację powstającej warstwy depozytów hydroksyapatytowych. Zakładam jednak, że badania takie zostaną jeszcze wykonane lub też zrealizowane będą przez inny zespół wchodzący w skład konsorcjum projektu.

3. W Rozdziale 5.1.2 podjęto próbę optymalizacji czasu syntezy PGA. Przedstawione wyniki pomiarów DSC, wyraźnie różnicują właściwości termiczne próbek PGA otrzymanych przy 4 różnych czasach reakcji, co potwierdziła również spektroskopia ^1H NMR. Jednak zbliżone wyniki, uzyskane zarówno przy pomiarach masy cząsteczkowej i jej polidispersji przedstawione w Tabeli 6, jak i widma w podczerwieni, nie pozwalają na wysuwanie tu niepodważalnych wniosków dotyczących wpływu czasu prowadzenia reakcji. Nie jestem także w pełni przekonany co do słuszności stwierdzenia, że cyt.: *"Skomplikowana budowa coraz bardziej rozgałęzionych struktur uzyskiwanych w wyższych temperaturach i podczas dłuższych syntez utrudnia zachodzenie reakcji sieciowania. Większa długość liniowej cząsteczki jest natomiast dla sieciowania korzystna"*. Wiadomym jest, że w większości reakcji polikondensacji, sieciowanie poprzedzone jest powstawaniem struktur rozgałęzionych.
4. Opisaną w Rozdziale 5.1.3 skuteczność oczyszczania PGA badano metodą spektroskopii ^1H NMR oraz chromatografii żelowej GPC. Zastosowanie tej ostatniej metody, z wykorzystaniem jedynie detektora refraktometrycznego, wzbudza ponownie moje wątpliwości jeśli chodzi o określanie zawartości struktur liniowych i rozgałęzionych. Aby określić stopień rozgałęzienia polimeru należy metodę GPC połączyć z dodatkową, niezależną metodą pomiaru, np. wiskozymetryczną lub szybkości sedymentacji. Najprościej byłoby jednak, przeprowadzić pomiar absolutnej masy cząsteczkowej z wykorzystaniem detektora wielokątowego rozpraszania światła.
5. Kolejna moja uwaga, mająca tak jak poprzednio charakter wyłącznie metodologiczny, dotyczy przedstawionych w Rozdziale 5.3.3, wyników pomiarów gęstości i porowatości dla kompozytów z PGA sieciowanym termicznie. Do określonych przez Autora jako "nietypowych" zmian gęstości skafoldów dla różnych stężeń bioszklą niemodyfikowanego i stopnia usieciowania na ich

właściwości fizyczne, przedstawione w Tabelach 20 i 21, nie przykładałbym większego znaczenia, a ich przyczyn upatrywałbym raczej w mało precyzyjnej metodzie oznaczania gęstości, co widoczne jest w zbliżonych wartościach gęstości i porowatości mieszczących się w obszarze odchylenia standardowego. Dla wysunięcia niepodważalnych hipotez dotyczących wpływu bioszklą na strukturę porowatą tych materiałów, rekomendowałbym przebadanie większej liczby próbek, o większym niż tylko dwa, zróżnicowaniu stężeń bioszklą, z zastosowaniem dokładniejszych metod porozymetrycznych.

6. W Rozdziale 5.2.2 dotyczącym sieciowania termicznego, Autor stwierdza, że cyt.: *"Mniejsze przewodnictwo cieplne teflonu względem szkła również przyczynia się do obniżania szybkości sieciowania."* Czy zastosowanie teflonowej formy o lepszych właściwościach izolacyjnych nie powinno zatem przyczynić się do zwiększenia temperatury w masie sieciującej próbki i w konsekwencji do zwiększenia szybkości sieciowania?
7. W podsumowaniu Rozdziału 5.1.3, dotyczącego optymalizacji procesu oczyszczania PGA, Autor stwierdza że z uwagi na wciąż wysoką cytotoksyczność oczyszczonych próbek, cyt.: *"Konieczne okazało się poszukiwanie metod zmniejszenia negatywnego oddziaływania PGA z tkankami żywymi."*, pozostawiając czytelnika bez informacji jakie to badania podjęto. W Rozdziale *Podsumowanie i wnioski*, pada co prawda stwierdzenie, że pomimo usunięcia znacznej ilości zanieczyszczeń konieczna okazała się jego dalsza modyfikacja chemiczna. Czy Autor miał tu na myśli proces sieciowania?
8. Rozprawa doktorska zawiera nieliczne błędy edytorskie i stylistyczne, których znaczenie można pominąć (np.: str. 26 *"powala uzyskiwać"*, str. 38 *"Kolbę nad mieszaniną reakcyjną przedmuchiwano azotem..."*, str. 77 *"...badanie wpływu czasu na kinetykę procesu..."*, oraz zaledwie kilka dostrzeżonych literówek).

Wymienione wyżej niedociągnięcia, mają charakter dyskusyjny i nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę recenzowanej pracy. Praca doktorska Pana mgr inż. Michała Grzymajło stanowi dojrzałe studium przedstawionego problemu naukowego. W dorobku Autora (który nie został zaprezentowany w pracy) znajduje się 8 artykułów opublikowanych

w latach 2018-2022, dotyczących bezpośrednio tematyki zaprezentowanej w pracy, w wysoko punktowanych czasopismach naukowych. Niestety Doktorant w żadnej z tych publikacji nie jest głównym autorem. Cytowania tych artykułów świadczą o nowatorstwie i innowacyjności tych prac oraz, że znajdują one oddźwięk w środowisku naukowym.

Recenzowana praca doktorska wnosi szereg ważnych elementów nowości do dziedziny chemii i inżynierii bio-kompozytów stosowanych w medycynie regeneracyjnej. Z uwagi na szerokie spektrum zastosowanych metod i doskonale, w ocenie recenzenta, przeprowadzoną analizę wyników, rezultaty pracy są istotnym wkładem w badania właściwości kompozytów polimerowych.

Pomimo, iż w pracy realizowano jedynie wybrane zadania większego projektu, to jako całość dysertacja stanowi wyjątkowo cenne rozwiązanie określonego problemu naukowego. Przeprowadzenie badania pozwoliły Doktorantowi w sposób kompleksowy na ocenę i optymalizację rozmaitych parametrów syntezy oraz sieciowania PGA na właściwości fizykochemiczne, biologiczne oraz przetwórcze kompozytów PGA/bioszkieło oraz określenie ich przydatności w charakterze skafoldów używanych w inżynierii tkankowej. Badania te pozwoliły m.in. na precyzyjne określenie mechanizmu sieciowania PGA, a skrupulatna optymalizacja każdego z procesów prowadzących do otrzymania końcowego materiału kompozytowego, stanowi, że wyniki te są niezwykle cenne dla dalszych badań i aplikacji. Myślę, że wyniki badań zawartych w niniejszej dysertacji, jak i uzyskane projekcie w ramach którego została wykonana praca doktorska, są lub będą także przedmiotem zastrzeżeń patentowych, jednak informacji o takowych w pracy nie zamieszczono.

W podsumowaniu chciałbym podkreślić, że mgr inż. Michał Grzymajło wykonał bardzo obszerne badania w celu otrzymania i zbadania właściwości nowych bio-kompozytów na bazie poli(adypinianu glicerolu) oraz bioszkieła, przeprowadził bardzo szczegółową i staranną analizę otrzymanych układów, wyciągając poprawne wnioski. Doktorant wykazał dużą biegłość w posługiwaniu się zaawansowanymi technikami pomiarowymi. Koncepcja pracy jest dojrzała i przemyślana. Na uznanie zasługuje wielka staranność widoczna zarówno w pracy eksperymentalnej jak i w edycyjnym przygotowaniu rozprawy. Dodatkowo, sama praca doktorska może stanowić kompendium wiedzy

o wysokich walorach poznawczych i praktycznych. Wszystkie te przesłanki skłaniają mnie do złożenia **wniosku o wyróżnienie pracy**.

Reasumując pragnę stwierdzić, iż nie mam wątpliwości, że recenzowana rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim przez "Ustawę o tytule i stopniach naukowych" i stawiam **wniosek o przyjęcie rozprawy Pana mgr inż. Michała Grzymajło i dopuszczenie go do dalszych etapów przewodu doktorskiego**.

Z wyrazami szacunku,



Prof. dr hab. inż. Krzysztof Strzelec



Signed by /
Podpisano przez:

Krzysztof Strzelec
Politechnika
Łódzka

Date / Data:
2022-07-22 08:47