



Prof. dr hab. Maria Nowakowska  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Jagielloński  
ul. R. Ingardena 3  
tel: ( 48 12) 663 2250  
email:nowakows@chemia.uj.edu.pl

## O C E N A

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

Praca doktorska Pana mgr inż. Michała Kwietnia została przygotowana w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk w Zabrze, pod opieką promotorską Pani dr hab. Grażyny Adamus, profesora nadzwyczajnego PAN.

Celem badań zrealizowanych w ramach niniejszej rozprawy było opracowanie metodologii oraz otrzymanie nowych, biodegradowalnych materiałów polimerowych, charakteryzujących się pożądanymi właściwościami fizykochemicznymi, bazujących na makrocząsteczkach o zaplanowanej i kontrolowanej strukturze, zawierających segmenty budulcowe biopoliestrów z grupy poli(hydroksyalkanianów) (PAH). Makrocząsteczki te zsyntetyzowano wykorzystując uprzednio otrzymane w procesie częściowej degradacji

oligomery PHA o kontrolowanej średniej masie molowej i strukturze chemicznej grup końcowych. Oligomery te pełniły funkcję makromonomerów w procesie polikondensacji z dichlorkiem kwasu sebacynowego lub makroinicjatorów polimeryzacji anionowej  $\beta$ -butyrolaktonu.

Cel pracy został dobrze zdefiniowany, a tematyka prowadzonych badań wpisuje się w aktualne, światowe trendy badawcze. W ostatnich latach obserwuje się duże zainteresowanie syntezą dobrze zdefiniowanych biodegradowalnych materiałów polimerowych. Wynika ono zarówno z potrzeby rozwiązywania problemów środowiskowych, będących skutkiem powszechnego stosowania syntetycznych materiałów polimerowych, które po okresie ich zamierzonej eksploatacji ulegają bardzo powolnej, trudno kontrolowanej i niejednokrotnie przebiegającej z utworzeniem niepożądanych (czasami toksycznych) produktów degradacji, jak również, z rosnącego zainteresowania możliwościami zastosowania tych materiałów w obszarze biomedycyny. Wyniki badań prowadzonych przez Pana mgr inż. Kwietnia mogą być przydatne w obu tych obszarach, chociaż w niniejszej pracy Autor zaakcentował głównie możliwości otrzymania materiałów potencjalnie przydatnych do zastosowań biomedycznych.

Pan mgr inż. Kwiecień przygotował i przedstawił rozprawę doktorską w tradycyjnej formie zwięzłego, liczącego 130 stron opracowania. Otwiera je krótkie wprowadzenie, po którym następuje przegląd literatury, określenie celu i zakresu pracy, omówienie wyników, podsumowanie i wskazanie najważniejszych osiągnięć, charakterystyka użytych materiałów, metod i procedur badawczych oraz spis literatury. Liczący 42 strony, przegląd literatury, prezentujący aktualny stan wiedzy w przedmiocie badań, podzielony został na sześć rozdziałów, w których Doktorant zawarł najważniejsze informacje dotyczące kolejno: naturalnych biopolimerów, ze szczególnym uwzględnieniem polihydroksyalkanianów, właściwości, obszarów zastosowań i metod wykorzystywanych do modyfikacji tej grupy polimerów, a także przybliżył zagadnienia dotyczące syntetycznych analogów biopoliestrów. W mej ocenie dobór zagadnień omawianych w tej części pracy jest prawidłowy i logiczny. Wszystkie podjęte wątki tematyczne znajdują odniesienie w badaniach własnych prowadzonych przez Doktoranta. Prezentowane zagadnienia omówione zostały jasno, a jednocześnie dostatecznie wyczerpująco i precyzyjnie. Tę część rozprawy przygotował Pan mgr inż. Kwiecień na podstawie dobrze wyselekcjonowanych pozycji literaturowych - w liczbie 245. Lektura literaturowej części rozprawy pozwala mi stwierdzić, że Doktorant

posiada dobrą znajomość aktualnego stanu wiedzy w przedmiocie prowadzonych przez Niego badań.

W części doświadczalnej pracy wyróżnić można trzy, następujące po sobie sekwencje badawcze. W pierwszej z nich przedstawiono wyniki badań nad otrzymywaniem reaktywnych makroinicjatorów i makromonomerów PHA w wyniku kontrolowanej degradacji polihydroksyalkanianów. I tak, stosując metodę selektywnej redukcji polihydroksyalkanianów, w szczególności biopolimerów: poli(3-hydroksymaślan-*ko*-4-hydroksymaślanu) (P3HB4HB) i poli(3-hydroksymaślan-*ko*-3-hydroksyheksanianu) (PHBH) oraz polimeru syntetycznego, ataktycznego poli[(R,S)-3-hydroksymaślanu] ([R,S]PHB), przebiegającej przy użyciu borowodorku litu jako czynnika redukującego otrzymano oligoestrodiole, jednorodne oligomery PHA zawierające w swej strukturze dwie hydroksylowe grupy końcowe. Prowadząc reakcje w tetrahydrofuranowych roztworach polimerów o ustalonych stężeniach, w temperaturze poniżej 20 C optymalizowano ich przebieg zmieniając ilość dodanego czynnika redukującego. Strukturę otrzymanych produktów określano w oparciu o pomiary widm magnetycznego rezonansu protonowego <sup>1</sup>H NMR i wyniki pomiarów prowadzonych przy użyciu spektrometrii mas z jonizacją metodą elektrorozpyłania (ESI-MS). Wartości średnich mas molowych oligomerów wyznaczano metodą chromatografii żelowej (GPC). Wykazano, że zaproponowana metoda degradacji może być zastosowana do otrzymywania oligoestrodiole z polihydroksyalkanianów o zróżnicowanej budowie chemicznej i różnej mikrostrukturze łańcucha. Stwierdzono także, iż metoda cechuje się wysokim stopniem specyficzności i prowadzi do otrzymania teoretycznie przewidywanych produktów degradacji. Ponadto stopień degradacji może być kontrolowany ilością czynnika redukującego wprowadzonego do środowiska reakcji.

Prowadzono także badania nad możliwością wykorzystania innej metody kontrolowanej degradacji polihydroksyalkanianów polegającej na indukowanej karboksylanami termicznej degradacji tych polimerów. W badaniach wykorzystano poli(3-hydroksymaślan-*ko*-4-hydroksymaślan) o liczbowo średniej masie molowej 250 000 g/mol, zawierający 8,8 % molowych jednostek 4-hydroksymaślanu, którego degradację indukowano przy użyciu octanu potasu. Stwierdzono, że w obecności octanu potasu proces degradacji przebiega już w temperaturze 180 C podczas gdy piroliza tego polimeru zachodzi w temperaturze 290 C. Postęp degradacji był determinowany czasem ekspozycji próbki na działanie podwyższonej temperatury i monitorowany poprzez pomiary wartości średnich mas molowych metodą chromatografii żelowej GPC. Strukturę otrzymanych oligomerów określano w oparciu o wyniki pomiarów widm magnetycznego rezonansu protonowego i

spektrometrii mas z jonizacją metodą elektrorozpylania. Przeprowadzone badania wykazały, że w wyniku procesu degradacji termicznej P3HB4HB indukowanej octanem potasu możliwym jest otrzymanie pożądaných w dalszych badaniach liniowych oligomerów zakończonych krotonianowymi i karboksylanowymi grupami końcowymi. Tworzenie liniowych (a nie cyklicznych oligomerów) potwierdzono dodatkowo prowadząc reakcję estryfikacji grupy karboksylowej trimetylosillilodiazometanem. W oparciu o uzyskane wyniki postulowano, że indukowana octanem potasu, zdolnym do oderwania protonu od węgla C2 jednostki konstytucyjnej 3HB biopoliestru P3HB4HB, degradacja termiczna tego polimeru przebiega zgodnie z mechanizmem  $\alpha$ -deprotonacji. Otrzymanie oligomerów o pożądaney masie molowej może być kontrolowane doborem czasu reakcji. W opisie warunków, w jakich prowadzono proces degradacji nie znalazłam informacji dotyczącej atmosfery, w której ona przebiegała, tzn. czy tworzył ją gaz obojętny czy też obecny był tlen. Jeśli proces był prowadzony w obecności tlenu istnieje obawa o tworzenie produktów ubocznych, szczególnie, że w procesie degradacji powstają produkty zawierające nienasycone wiązania węgiel-węgiel.

Następna, w mym przekonaniu, bardzo interesująca i wartościowa sekwencja prowadzonych przez Doktoranta badań dotyczyła syntezy nowych materiałów polimerowych zawierających segmenty strukturalne biopoliestrów. W pierwszym etapie prowadzono syntezę kopoliestrów na drodze kondensacji oligoestrodioleli otrzymanych w procesie kontrolowanej redukcji poli(3-hydroksymaślanu-*ko*-3-hydroksyheksanianu) (PHBH) przy użyciu borowodorku litu PHBH o średnich masach molowych w zakresie od 1200 do 3500 g/mol oraz dichlorku kwasu sebacynowego. Proces polikondensacji prowadzono w masie, stosując równomolowy stosunek obu reagentów. Reakcję prowadzono, w temperaturze 129 C pod zmniejszonym ciśnieniem 600 mm Hg. Masy molowe uzyskanych polimerów oznaczano przy pomocy chromatografii żelowej zaś ich strukturę w oparciu o wyniki badań techniką węglowego rezonansu paramagnetycznego  $^{13}\text{C}$  NMR. W wyniku prowadzonych syntez otrzymano terpoliestry zawierające trzy rodzaje jednostek konstytucyjnych: jednostki 3-hydroksymaślanowe (3HB), jednostki 3-hydroksyheksanianowe (3HH) oraz jednostki konstytucyjne pochodzące od kwasu sebacynowego (SEB). Dzięki wykorzystaniu oligoestrodioleli różniących się średnią masą molową otrzymano terpolimery o zróżnicowanym składzie chemicznym, różniące się zasadniczo właściwościami termicznymi – temperaturami przejścia szklistego  $T_g$ , temperaturami topnienia  $T_m$ , jak wykazano stosując techniki DSC i TGA. Zsyntetyzowane terpoliestry charakteryzują się wyższą stabilnością termiczną niż wyjściowy biopoliester PHBH. Wraz ze wzrostem zawartości jednostek konstytucyjnych

pochodzących od kwasu sebacynowego obniża się wartość temperatury przejścia szklistego. Co istotne, w kontekście możliwych aplikacji, otrzymane terpoliestry charakteryzują się znacznie niższymi wartościami  $T_g$  niż bipolimer PHBH, przy zachowaniu relatywnie wysokiej wartości  $T_m$ .

W kolejnym etapie badań opracowano metodę syntezy kopolimerów blokowych poli(3-hydroksymaślan-*ko*-4-hydroksymaślan)-blok- poli(3-hydroksymaślan) (P3HB4HB-*blok*-[R,S]PHB). Proces przebiegał poprzez inicjowaną makroinicjatorami anionową polimeryzację z otwarciem pierścienia laktonowego  $\beta$ - butyrolaktonu. Użyte makroinicjatory zakończone krotonianowymi i karboksylanowymi grupami końcowymi otrzymano w procesie kontrolowanej degradacji termicznej biopoliestru P3HB4HB indukowanej octanem tetrabutylamoniowym. Zsyntetyzowano kopolimery blokowe P3HB4HB-*blok*-[R,S]PHB zawierające bloki pochodzące od izotaktycznego biopoliestru P3HB4HB oraz od ataktycznego [R,S]PHB.

Otrzymane kopolimery blokowe P3HB4HB-*blok*-[R,S]PHB o średniej masie molowej w zakresie 7 100 do 12 300 g/mol charakteryzowano przy użyciu chromatografii żelowej, paramagnetycznego rezonansu jądrowego, a także analizy termogravimetrycznej i różnicowej kalorymetrii skaningowej. Strukturę blokową kopoliestrow potwierdzono przeprowadzając selektywną ekstrakcję, stosując metanol jako selektywny rozpuszczalnik, rozpuszczający dobrze poli[(R,S)-3-hydroksymaślan], zaś będący nierozpuszczalnikiem dla oligomerów P3HB4HB, skorelowaną z pomiarami widm  $^1\text{H}$  NMR. Badania kopolimerów blokowych P3HB4HB-*blok*-aPHB prowadzone przy użyciu różnicowej kalorymetrii skaningowej wykazały, że charakteryzują się one obecnością tylko jednej temperatury przejścia szklistego  $T_g$ , której wartość znajduje się pomiędzy tymi wyznaczonymi dla makroinicjatora i homopolimeru [R,S]PHB i zależy od zawartości poszczególnych bloków. Wykazano także, iż zawartość poszczególnych bloków wpływa na stopień krystaliczności kopolimeru – zasadniczo obecność bloków pochodzących od fragmentu [R,S]PHB obniża w sposób znaczący krystaliczność materiału. Badania degradacji hydrolitycznej otrzymanych kopolimerów blokowych prowadzone w roztworze buforowym o pH = 7.4 w temperaturze 70 C przez okres 80 dni potwierdziły, że kopoliestry degradują szybciej niż biopoliester P3HB4HB i, że zgodnie z oczekiwaniami, degradacji ulegają w pierwszej kolejności obszary amorficzne badanych materiałów. Powyższe obserwacje są istotne w kontekście możliwości planowania syntezy materiału o pożądanym właściwościach fizykochemicznych i podatności hydrolitycznej.

Trzecia sekwencja prowadzonych badań dotyczyła próby oceny możliwości zastosowania otrzymanych materiałów polimerowych w rozwiązywaniu określonych problemów biomedycznych. Badania te mają charakter wstępnych studiów rozpoznawczych. Tak więc przeprowadzono badania nad wykorzystaniem terpoliestrow poli(3HB-*ko*-3HH-*ko*-SEB) do sporządzania trójwymiarowych porowatych rusztowań do hodowli komórkowych. W tym celu formułowano z roztworu polimeru w chlorku metylenu obiekt trójwymiarowy zawierający określoną ilość chlorku sodu. Wyflukanie chlorku sodu zapewniło porowatą strukturę materiału, co zobrazowano przy użyciu mikroskopii elektronowej SEM. Materiał ten jest obecnie wykorzystywany w badaniach dotyczących hodowli komórek w partnerskim laboratorium zagranicznym.

Podjęto także badania nad możliwością wykorzystania otrzymanych kopolimerów blokowych, w szczególności PHB-blok-[R,S]PHB zawierającego 80 % molowych bloku [R,S]PHB do uzyskania cienkich (7-8  $\mu\text{m}$ ) biodegradowalnych, chemokompatybilnych, elastycznych i wytrzymałych na naprężenia wewnętrzne powłok pokrywających biomimetyczny poliuretan stosowany w badaniach nad konstrukcją protezy serca. Wstępne badania właściwości fizykochemicznych i mechanicznych tych powłok, a także badań biologicznych (testy cytotoksyczności) użytych polimerów oraz modelowe badania dotyczące ich degradacji w sztucznym płynie fizjologicznym (SBF) są obiecujące. Badania te prowadzone są we współpracy z Fundacją Rozwoju Kardiochirurgii w ramach Programu Polskie Sztuczne Serce i z pewnością są warte kontynuacji.

Prowadzono także badania nad wykorzystaniem kopolimerów blokowych PHA-*blok*-[R,S]PHB do uszczelniania protez naczyń krwionośnych wytwarzanych z włókien poliestrowych. Powierzchnie komercyjnie dostępnych protez naczyniowych DALLONR H pokryto warstwą kopolimeru blokowego PHA-*blok*-[R,S]PHB metodą elektroprzędzenia. Testy przepuszczalności wody, przeprowadzone zgodnie z polską normą, w Instytucie Biopolimerów i Włókien Chemicznych w Łodzi były pozytywne i wykazały, że naniesiona warstwa polimeru wykazuje pewien efekt uszczelniający.

### **Wnioski końcowe.**

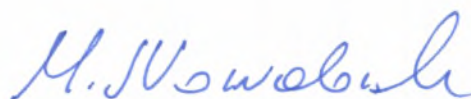
Po starannym zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pana mgr inż. Michała Kwietnia stwierdzam, że główny cel pracy został dobrze zdefiniowany, a dobór materiału i metod

badawczych pozwolił na jego realizację. Studia przeprowadzone w ramach niniejszej pracy należą do głównego, światowego nurtu badań nad nowymi materiałami polimerowymi charakteryzującymi się pożądanymi właściwościami użytkowymi, w szczególności łączącymi unikalne cechy materiałów pochodzenia naturalnego z tymi charakterystycznymi dla materiałów syntetycznych, których strukturę można planować w skali molekularnej. Zaprezentowane w pracy badania mają charakter studiów interdyscyplinarnych, wymagających od Doktoranta dobrego przygotowania i wiedzy z zakresu kilku gałęzi chemii, inżynierii materiałowej i biologii. Pomyślna realizacja badań była możliwa dzięki zastosowaniu szeregu nowoczesnych, komplementarnych technik badawczych. Doktorant opanował zarówno podstawy fizykochemiczne jak i zdobył kompetencje instrumentalne umożliwiające właściwy dobór technik badawczych, przeprowadzenie pomiarów i interpretację wyników. Wykazał się dobrym przygotowaniem merytorycznym i dużą sprawnością eksperymentalną. Praca napisana jest starannie a nieliczne błędy i potknięcia językowe nie utrudniają zrozumienia głównego nurtu narracji.

Na podstawie bazy danych Scopus ustaliłam, że Pan mgr inż. Kwiecień jest współautorem 4 dotyczących ściśle problematyki badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej publikacji w prestiżowych specjalistycznych czasopismach naukowych takich jak: *Biomacromolecules*, *Polymer Degradation and Stability*, *European Polymer Journal*.

Biorąc pod uwagę powyższe uważam, że spełnione są warunki ustawy o stopniach i tytułach naukowych z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. nr 65) znowelizowanej w dniu 18 marca 2011 r. (Dz.U. 2011 nr 84 poz. 455) i wnoszę do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej o dopuszczenie Pana mgr inż. Michała Kwietnia do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną pracy, fakt opublikowania znacznej części zawartych w niej wyników w uznanych specjalistycznych czasopismach naukowych wnoszę o jej wyróżnienie.



Kraków 12 maj 2015 r.