

dr hab. inż. Małgorzata M. Jaworska, profesor PW
Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej
Politechnika Warszawska

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Piekłarz

**pt. „Hydrożele chitozanowe, wzbogacone nanostrukturalnymi materiałami węglowymi,
przeznaczone na scaffolds do hodowli komórkowych”**

Promotor: dr hab. inż. Piotr Owczarz, profesor uczelni

Opiekun pracy: dr hab. Zofia Modrzejewska

1. Treść i zakres rozprawy doktorskiej

Praca przedstawiona do oceny poświęcona jest sprawdzeniu możliwości wykorzystania termowrażliwych hydrożeli wytworzonych na bazie chitozanu do zastosowań jako rusztowania dla hodowli komórek zwierzęcych. Głównym celem pracy było sprawdzenie wpływu 5'-monofosforanuurydyny (UMP) oraz obecności tlenu grafenu na własności fizyczne, chemiczne i biologiczne wytworzonych hydrożeli.

Dużym wyzwaniem dla współczesnej medycyny jest leczenie uszkodzeń tkanek powstałych w wyniku urazów, przewlekłego stanu zapalnego czy zmian zwyrodnieniowych. Uszkodzenia te wymagają często zastosowania rozwiązań z zakresu inżynierii tkankowej. Przy takim podejściu należy zastosować w miejscu zmienionym chorobowo rusztowania do hodowli komórkowych wspomagające namnażanie się właściwej tkanki. Materiał rusztowania musi być biokompatybilny, nietoksyczny, nie może wywoływać stanu zapalnego a dodatkowo powinien umożliwiać adhezję, proliferację oraz różnicowanie się komórek. Doktorantka swoją uwagę skierowała na termowrażliwe żele chitozanowe spełniające większość wymagań dotyczących materiałów na scaffolds. Termożele chitozanowe cechuje przejście żół-żel w temperaturze zbliżonej do temperatury ciała ludzkiego. W literaturze przedmiotu szeroko omawiane są scaffolds chitozanowe wykorzystujące jako środek sieciujący sól sodową β -glicerofosforanu (β -GP), natomiast Doktorantka zaproponowała wykorzystanie soli sodowej 5'-monofosforanu urydyny (UMP). UMP to związek organiczny, nukleotyd pirymidynowy, budujący cząsteczkę RNA, biorący udział w syntezie glikogenu, fosfolipidów, a sama urydyna ma znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego. Dodatkowo termowrażliwe scaffolds chitozanowe sieciowane UMP wzbogacono nanostrukturalnym materiałem węglowym w postaci tlenu

grafenu. Tego typu rusztowania, poza pracami Doktorantki, nie były prezentowane w literaturze przedmiotu.

Uważam badania podjęte przez Doktorantkę za ważne zarówno ze względów poznawczych jak i ze względów społecznych i aplikacyjnych.

Zakres pracy obejmował scharakteryzowanie własności fizykochemicznych i biologicznych hydrożeli chitozanowych utworzonych z wykorzystaniem kwasu solnego lub kwasu mlekowego jako rozpuszczalnika dla chitozanu oraz wykorzystanie β -GP lub UMP jako środka sieciującego, przeprowadzenie badań reologicznych w celu określenia temperatury przejścia żoź-żel oraz czasu żelowania, scharakteryzowanie struktury hydrożeli na bazie analizy widm FTIR, analizę morfologii hydrożeli z wykorzystaniem zdjęć uzyskanych z SEM, analizę termiczną wykorzystując DSC, określenie uwalniania związku sieciującego w trakcie kondycjonowania hydrożeli w wodzie wykorzystując widma FTIR oraz dyfraktogramy XRD, przeprowadzenie badań cytotoksyczności i genotoksyczności przygotowanych hydrożeli. Po zmodyfikowaniu hydrożeli nanocząstkami węglowymi w postaci tlenku grafenu wykonano charakterystykę otrzymanych hydrożeli wykonując ponownie wszystkie wymienione powyżej analizy.

Praca podzielona została na trzy części: część literaturową (7 rozdziałów), część badawczą poświęconą niemodyfikowanym termowrażliwym hydrożelom chitozanowym (5 rozdziałów) oraz część badawczą poświęconą modyfikowanym (nanokompozytowym) termowrażliwym hydrożelom chitozanowym (5 rozdziałów) uzupełnione spisem literatury, spisem tabel, spisem rysunków. Praca ma dobrą konstrukcję i prowadzi czytelnika przez zagadnienia poruszane i badane w pracy, szczegółowo omawiając wszystkie kroki i uzasadniając podjęcie kolejnych badań/analiz.

Cel i zakres rozprawy zostały wyraźnie określone, zaś przedstawione wyniki badań pozwalają stwierdzić, że zamiary zostały osiągnięte. Badania zaprezentowane w pracy zostały dobrze przemyślane, umotywowane i rzetelnie zrealizowane przez Doktorantkę.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska p. mgr inż. Katarzyny Piekłarz liczy 232 strony z licznymi rysunkami, tabelami, streszczeniem w języku polskim i angielskim, spisem literatury (337 pozycji) i dorobkiem naukowym Doktorantki.

2. Ocena merytoryczna rozprawy

Recenzowana rozprawa doktorska miała na celu wytworzenie nowych struktur chitozanowych w postaci termowrażliwych hydrożeli, formujących się w temperaturze zbliżonej do fizjologicznej temperatury ciała ludzkiego, przeznaczonych do zastosowania w inżynierii tkankowej.

Należy szczególnie podkreślić fakt, że Doktorantka bardzo umiejętnie wybrała i przedstawiła dane literaturowe prezentując jedynie te informacje, które są niezbędne dla śledzenia toku pracy. Biorąc pod uwagę, że tematyka hydrożeli chitozanowych jest bardzo obszerna, umiejętność wybrania informacji istotnych dla rozprawy była niezwykle ważna. Doktorantka w pełni sobie z tym poradziła, w dojrzały i analityczny sposób prezentując najważniejsze informacje dotyczące zarówno wykorzystywanych materiałów jak i stosowanych w pracy metod analitycznych.

Część badawczą podzielono na 2 etapy: charakterystykę niemodyfikowanych hydrożeli oraz charakterystykę hydrożeli modyfikowanych tlenkiem grafenu. Każda z tych części

rozpoczyna się zaprezentowaniem bardzo szczegółowych informacji dotyczących stosowanych materiałów (chitozan, rozpuszczalniki, środki wspierające sieciowanie, tlenek grafenu), preparatyki hydrożeli chitozanowych i metod badawczych (pomiary reologiczne, NMR, FTIR, XRD, SEM, DSC, badania cytotoxycności, badania genotoksycności).

Badania poświęcone niemodyfikowanym hydrożelom Doktorantka rozpoczęła prezentując wyniki badań reologicznych. Badania przeprowadzono w warunkach nieizotermicznych (z rosnącą temperaturą w zakresie 5° - 60°C), co pozwoliło na wyznaczenie modułu zachowawczego i modułu stratności, a w następnym kroku określenie temperatury przejścia żol-żel. Temperatura przejścia zależała od zastosowanego rozpuszczalnika oraz od zastosowanego związku sieciującego. Doktorantka zaobserwowała podwójne przejście żel-żol-żel dla chitozanów sieciowanych UMP. Struktury te cechowały się także krótszym czasem żelowania w temperaturze 37°C w porównaniu ze strukturami sieciowanymi β -GP. Pomiar reologiczny zostały potwierdzone w oparciu o pomiary NMR. Struktura przestrzenna hydrożeli została zobrazowana z wykorzystaniem SEM pokazując dużą porowatość struktur otrzymanych z UMP jako środka sieciującego. Stanowi to ważną obserwację, gdyż takie struktury są preferowane w inżynierii tkankowej.

Kolejnym ważnym etapem badań było określenie mechanizmu formowania hydrożeli chitozanowych. Doktorantka przeprowadziła analizy widm FTIR żeli chitozanowych, żeli po sieciowaniu β -GP i UMP oraz żeli po badaniach uwalniania środków sieciujących, Analizę widm uzupełniono analizą termiczną z wykorzystaniem DSC i analizą dyfraktogramów XRD. Na tej podstawie Doktorantka zaproponowała mechanizm tworzenia termowrażliwych żeli chitozanowych sieciowanych β -GMP wyjaśniając mechanizm przejścia żol-żel oraz zaproponowała mechanizm tworzenia termowrażliwych żeli chitozanowych sieciowanych UMP wyjaśniając mechanizm przejścia żel-żol-żel.

W celu potwierdzenia możliwości wykorzystania opracowanych hydrożeli w inżynierii tkankowej, Doktorantka przeprowadziła badania cytotoxycności i genotoksycności. Badania cytotoxycności przeprowadzono z wykorzystaniem linii komórkowej ludzkich komórek gruczolaka okrężnicy HT-29. Komórki te wykazują dużą wrażliwość na związki cytotoxyczne. Badania genotoksycności wykonano z wykorzystaniem prawidłowej linii komórek fibroblastów ludzkich BJ. Oba badania wykonano zgodnie z odpowiednią normą opisującą metodę biologicznej oceny wyrobów medycznych. W obu przypadkach (cytotoxycności i genotoksycności) wykazano brak działań szkodliwych zarówno w przypadku hydrożeli sieciowanych β -GP jak i UMP.

Badania poświęcone hydrożelom modyfikowanym tlenkiem grafenu prowadzono przy 3 stężeniach nanocząstek: 0,028 mg/mL, 0,055mg/mL i 0,1 mg/mL. Przygotowano hydrożele z kwasem solnym lub kwasem mlekowym jako rozpuszczalnikiem chitozanu oraz z β -GP lub UMP jako związkiem sieciującym. Przygotowane scaffolds poddano analizie reologicznej. Obecność węglowych nanocząstek wpłynęła na obserwowane temperatury przejścia (żel)-żol-żel jednocześnie wpływając na poprawę właściwości mechanicznych hydrożeli. Analiza widm FTIR wykazała, iż bez względu na rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika oraz użytego środka wspierającego sieciowanie, w widmach nie zaobserwowano pasm absorpcyjnych charakterystycznych dla tlenku grafenu. Świadczy to o dobrym zdyspergowaniu nanocząstek w strukturze polimeru. Może to także wskazywać na działanie synergiczne wiązań wodorowych i oddziaływań elektrostatycznych występujących pomiędzy chitozaniem a tlenkiem grafenu.

Zdjęcia SEM nie wykazały istotnych różnic w strukturze hydrożeli niemodyfikowanych i modyfikowanych tlenkiem grafenu. Podobnie jak badania cytotoksyczności i genotoksyczności. Dla wszystkich hydrożeli uzyskano przeżywalność komórek na poziomie co najmniej 80% oraz brak genotoksyczności lub genotoksyczność w stopniu niewielkim.

Reasumując przedstawiony materiał można stwierdzić, że opracowane przez Doktorantkę nowatorskie hydrozele termowrażliwe przygotowane z roztworów mleczanu chitozanu z β -GP i z UMP zarówno niemodyfikowane jak i modyfikowane tlenkiem grafenu mają duży potencjał aplikacyjny jako scaffolds w inżynierii tkankowej.

W pracy w sposób szczegółowy przedstawiono stosowane metody analityczne, sposób wytwarzania niemodyfikowanych i modyfikowanych termowrażliwych hydrożeli chitozanowych oraz sposób prowadzenia badań. Wszystkie elementy zostały przedstawione w sposób wyczerpujący, pozwalający na odtworzenie i powtórzenie przeprowadzonych eksperymentów. Dodatkowo metody wykorzystywane w analizach fizyko-chemicznych były oparte o najnowsze techniki analityczne (GPC/SEC, FTIR, NMR, DSC, DMTA, SEM). Metody wykorzystywane w badaniach biologicznych były metodami publikowanymi w normach. Doktorantka swobodnie porusza się we wszystkich technikach i to zarówno fizyko-chemicznych jak i biologicznych. Sposób wykonywania analiz jest dokładnie opisany i świadczy o dużej znajomości wykorzystywanych technik

Stwierdzam, że mgr inż. Katarzyna Piekłarz zrealizowała wyznaczone w pracy cele, wykazała się umiejętnością planowania i właściwej realizacji prac badawczych, a uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w rozwój badań nad tworzeniem termowrażliwych hydrożeli chitozanowych przeznaczonych do zastosowań w inżynierii tkankowej. Wyniki badań Doktorantki zostały opublikowane w 4 publikacjach zamieszczonych w czasopiśmie z tzw. „Listy filadelfijskiej” i 5 publikacji zamieszczonych w czasopiśmie spoza „listy” (indeks Hirscha 6, liczba cytowań 126 wg Scopus), Doktorantka jest także współautorką 2 patentów oraz laureatką 10 nagród, brała udział w 6 konferencjach międzynarodowych oraz 29 konferencjach krajowych.

Oceniając aspekty poznawcze rozprawy doktorskiej, za istotne osiągnięcia Doktorantki można uznać:

- opracowanie metody otrzymywania termowrażliwych żeli chitozanowych z UMP jako środka wspierającego sieciowanie,
- wyznaczenie temperatury i czasu żelowania dla układów z UMP,
- zaproponowanie mechanizmu przejścia zol-żel dla żeli z β -GP jako środka wspierającego sieciowanie,
- zaproponowanie mechanizmu przejścia żel-zol-żel dla żeli z UMP,
- wykazanie braku cytotoksyczności oraz genotoksyczności przygotowanych hydrożeli,
- opracowanie metody tworzenia termowrażliwych hydrożeli chitozanowych zawierających nanocząstki węglowe w postaci tlenku grafenu i ich charakterystyka fizykochemiczna i biologiczna.

W trakcie czytania pracy nasuwają się jednak pewne pytania, które mogą stanowić podstawę dyskusji:

1. W pracy wykorzystano 5'-monofosforan urydyny jako związek wspomagający sieciowanie. Czy możliwe jest wykorzystanie innych nukleotydów w tworzeniu termowrażliwych żeli chitozanowych?
2. Rys. 12.20 i 12.21: Na wykresach przedstawiających termogramy DSC z UMP jako środkiem wspomagającym sieciowanie zaobserwowano efekt endotermiczny przy temperaturze 56-57°C. Z jakim efektem jest związane to pasmo??
3. Obecność tlenku grafenu wpłynęła na temperaturę żelowania obniżając nawet znacznie jej wartość co przedstawiono w Tabeli 16.1. Czy istnieje korelacja między stężeniem tlenku grafenu a temperaturą przejścia żół-żel?
4. Rysunki 16.7 i 16.8 przedstawiają zmiany współczynnika tłumienia w funkcji temperatury. Wykresy dla próbek zawierających tlenek grafenu w stężeniu 0,1 mg/mL leżą w całości w obszarze żelu. Czy to oznacza, że proces żelowania zachodził już w momencie dodania GO do roztworu?
5. Doktorantka na podstawie widm FTIR hydrożeli z tlenkiem grafenu wnioskuje, że cząstki węglowe były dobrze zdyspergowane. Czy obecność GO mogła wpływać na strukturę krystaliczną wytworzonych hydrożeli?

Uwagi o charakterze edytorskim:

1. Tabela 9.1 i 13.1.: przywołany w tabeli wzór sumaryczny chitozanu odnosi się do dimeru a nie do cząsteczki chitozanu
2. Tabela 12.1.: W tabeli zamieszczono temperaturę żelowania hydrożeli oraz czas żelowania. Brakuje informacji, że czas żelowania był mierzony w 37°C a nie w zamieszczonych temperaturach. Brak tej informacji jest mylący dla czytelnika

Uwagi przedstawione powyżej, poczynione z obowiązku recenzenta, nie umniejszają wartości poznawczej rozprawy.

3. Wniosek końcowy

Praca nie budzi zastrzeżeń zarówno pod względem formalnym, jaki i merytorycznym. Została sformułowana poprawnie i wnosi wiele elementów nowości naukowej. Analiza danych doświadczalnych jest prawidłowa. Uzyskane wyniki znacznie poszerzają wiedzę na temat tworzenia termowrażliwych hydrożeli chitozanowych do zastosowań w inżynierii tkankowej. Opracowanie stanowi oryginalny dorobek autorki.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska p. mgr inż. Katarzyny Piekłarz spełnia wymagania formalne w odniesieniu do pracy doktorskiej, odpowiada wymogom aktualnej ustawy o tytule i stopniach naukowych. Zwracam się, zatem do Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej w dyscyplinie nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia o przyjęcie pracy oraz dopuszczenie p. mgr inż. Katarzyny Piekłarz do dalszych etapów postępowania przewidzianego w przewodzie doktorskim. Jednocześnie wysoko oceniając przedstawioną do oceny pracę wnioskuję o jej wyróżnienie.


dr hab. inż. Małgorzata Jaworska