

Ocena pracy doktorskiej Pani **mgr inż. Beaty Niemczyk-Soczyńskiej**

pt.: **„Thermosensitive hydrogels loaded with bioactive nanofibres as scaffolds for tissue engineering”**

zrealizowanej pod kierunkiem promotora,
prof. dr hab. inż. Pawła Łukasza Sajkiewicza
oraz promotora pomocniczego,
dr inż. Arkadiusza Gradysa

w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych i w dyscyplinie inżynieria materiałowa

Recenzja została opracowana na podstawie uchwały Rady Naukowej Instytutu
Podstawowych Problemów Techniki PAN z dnia 3 lipca 2023.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została napisana w języku angielskim i ma formę przewodnika do siedmiu publikacji, z których dwie mają charakter prac przeglądowych, a pozostałych pięć dotyczy przeprowadzonych prac badawczych. Praca składa się z 9 rozdziałów poprzedzonych streszczeniem (brakuje jednak streszczenia w języku polskim), a następnie Autorka zamieściła wprowadzenie, przedstawiła cel pracy i hipotezy badawcze, zastosowane materiały i metody badawcze oraz w sposób zwięzły omówiła zawartość poszczególnych artykułów, przedstawiając wyciągnięte wnioski i wykaz literatury. Pracę kończą przedruki publikacji oraz oświadczenia Doktorantki dotyczące Jej wkładu w przygotowanie publikacji, poświadczane przez współautorów i promotora. Niniejsza recenzja zawiera ocenę merytoryczną i naukową pracy doktorskiej w odniesieniu do aktualności i nowości podejmowanych zagadnień badawczych, poprawności doboru metod badawczych oraz technik eksperymentalnych.

Aktualność tematu pracy

Rozwój inżynierii tkankowej ukierunkowanej na wytwarzanie substytutów tkankowych z wykorzystaniem najczęściej polimerów naturalnych lub polimerów syntetycznych ulegających biodegradacji oraz komórek własnych pacjenta i czynników wzrostu, w co raz większym stopniu przyczynia się do wytwarzania substytutów tkankowych, które są zdolne do przejmowania funkcji chorych lub uszkodzonych tkanek lub narządów. Stopień skomplikowania wielu narządów, takich jak mózg lub rdzeń kręgowy znacząco zawęża możliwości współczesnej medycyny, głównie do stosowania implantów i leczenia bólu. Problemem jest zdolność do spontanicznej i funkcjonalnej regeneracji układu nerwowego oraz jego złożona budowa anatomiczno-histologiczna. Dlatego tak ważnym zadaniem inżynierii tkankowej centralnego układu nerwowego jest wytworzenie takich biomateriałów, które będą sprzyjały wzrostowi i różnicowaniu się komórek nerwowych. Na podstawie dokonanego przeglądu literatury, Doktorantka stwierdziła, że największy potencjał w tym obszarze mają hydrożele o odpowiednich właściwościach mechanicznych, przewodnictwie elektrycznym, biomimetycznej topografii (naśladującej włókna nerwowe) i polepszonych właściwościach biologicznych, głównie dzięki wprowadzonym substancjom leczniczym, komórkom lub czynnikom wzrostu. Co więcej, hydrożele wstrzykiwalne, które można wprowadzać za pomocą metod małoinwazyjnych stanowią największe wyzwanie, zwłaszcza jeśli byłyby dodatkowo modyfikowane/wzbogacane różnymi dodatkami, takimi jako nanocząstki lub nanowłókna. Spośród hydrożeli, Doktorantka szczególnie zainteresowała się polimerami termoczułymi, które wykazują zdolność sieciowania pod wpływem temperatury. Takie polimery naturalne, jak kwas hialuronowy, agaroza lub alginian wzbogacone różnymi dodatkami (mikro- i nanocząstkami, mikrosferami, włóknami lub czynnikami wzrostu) powinny mieć największy potencjał w regeneracji centralnego układu nerwowego. Co istotne, Doktorantka stwierdziła, że zastosowanie pojedynczej metody funkcjonalizacji nanocząstek lub nanowłókien może być niewystarczające dla tak złożonych i wymagających zastosowań, jak inżynieria tkankowa i na podstawie kolejnego przeglądu literatury stwierdziła, że połączenie kilku metod funkcjonalizacji, np. aminolizy i późniejszej immobilizacji biomolekuł lub hydrolizy, a następnie metody „layer-by-layer” (LBL), może przynieść synergiczny efekt poprawy hydrofilowości i biokompatybilności włókien poprzez zapewnienie aktywności biologicznej na ich powierzchni.

Doktorantka, na podstawie dokonanego przeglądu literatury, który był przedmiotem publikacji w czasopismach *J. Neural Eng.* (2018) i *Polymers* (2020) zajęła się badaniami nad wytwarzaniem termoczułych i wstrzykiwalnych systemów hydrożelowych zawierających krótkie bioaktywne nanowłókna wytworzone metodą elektroprzędzenia, stanowiące rusztowanie do zastosowań w inżynierii tkankowej lub potencjalnie jako modele 3D dla hodowli komórkowych guza mózgu w projektowaniu innowacyjnych terapii przeciwnowotworowych.

Redakcja dwóch artykułów przeglądowych świadczy o tym, że Doktorantka porusza się ze swobodą w tematyce materiałów hydrożelowych, zarówno biorąc pod uwagę uwarunkowania anatomiczne tkanek centralnego układu nerwowego jak i

właściwości materiałów hydrożelowych, które powinny zostać spełnione w spełnieniu oczekiwanych właściwości regeneracyjnych, i które są obecnie szeroko wykorzystywane w badaniach nad inżynierią tkankową tego złożonego układu. Autorka zwróciła szczególną uwagę na hydrożele napełnione różnymi mikro- i nanocząstkami, jako tymi o największym potencjalne aplikacyjnym oraz zgłębiła metody modyfikacji powierzchniowej włókien.

W oparciu o przeprowadzoną analizę stanu wiedzy, Doktorantka zaplanowała i wykonała badania, których głównym celem było opracowanie metody wytwarzania termowrażliwych hydrożeli na podstawie metylocelulozy i agarozy, zawierających krótkie włókna poli(L-kwasu mlekowego)(PLLA) funkcjonalizowane lamininą, które mogłyby stanowić po wstrzyknięciu kompozytowe rusztowanie naśladujące macierz zewnątrzkomórkową (*ang. extracellular matrix, ECM*) dla regeneracji centralnego układu nerwowego. Celem prac Doktorantki było znalezienie odpowiednich stężeń i udziału składników tworzących hydrożel oraz ocena szybkości sieciowania, właściwości termicznych i lepkością uzyskanych materiałów. Ponadto, istotną część badań stanowiło wytwarzanie nanowłókien PLLA metodą elektroprzędzenia oraz ich późniejsza fragmentacja za pomocą ultradźwięków. Opracowanie efektywnego sposobu funkcjonalizacji nanowłókien lamininą i wytworzenie kompozytów hydrożelowo-włóknistych wraz z badaniami ich wstrzykiwalności oraz oceną właściwości biologicznych tak wytworzonych materiałów stanowił zwieńczenie przeprowadzonego, obszernego programu badawczego. Aktualność tematyki pracy jest bezdyskusyjna ze względu na wartości poznawcze i potencjalne wykorzystanie wstrzykiwalnych kompozytów hydrożelowych w medycynie regeneracyjnej centralnego układu nerwowego i ewentualnie innych obszarach medycznych.

Analiza doboru technik eksperymentalnych i metodyk badawczych

Kluczowym elementem prac badawczych zrealizowanych przez Doktorantkę było opracowanie termowrażliwych hydrożeli polimerowych napełnionych bioaktywnymi nanowłóknami o potencjalnym wykorzystaniu jako rusztowania w inżynierii tkankowej, zwłaszcza tkanek układu nerwowego. Na podstawie przeprowadzonego przeglądu literaturowego, Doktorantka wytypowała naturalne związki, polisacharydy: metylocelulozę i agarozę jako składniki termoczułych hydrożeli, które z kolei napełniała krótkimi włóknami uzyskanymi po sonikacji nanowłókien PLLA. Co więcej, poprzez modyfikację nanowłókien lamininą nadała im bioaktywność, którą udowodniła w testach biologicznych. Doktorantka bardzo skrupulatnie zaprojektowała program badawczy, zaczynając od opracowania roztworów metylocelulozy oraz mieszanin metylocelulozy i agarozy w celu ustalenia ich lepkości, termozelowania, szybkości sieciowania i oceny ich właściwości biologicznych. Ponadto, Doktorantka wykorzystwała metodę elektroprzędzenia do wytwarzania nanowłókien z PLLA, które następnie poddawała fragmentacji za pomocą ultradźwięków. Ustaliła warunki, które zarówno były korzystne dla wytwarzania nanowłókien, jak i potem nie powodowały redukcji mas cząsteczkowych podczas ich fragmentacji. Finalnie, poprzez optymalizację wzajemnego udziału składników mieszaniny oraz zawartości krótkich włókien PLLA modyfikowanych lamininą, Doktorantka sprawdziła wstrzykiwalność wytworzonych układów

naśladujących strukturę ECM. Do badania wytworzonych hydrożeli, nanowłókien polimerowych i ostatecznie materiałów kompozytowych na podstawie tych składników, Doktorantka wykorzystała szereg nowoczesnych i adekwatnych metod do oceny właściwości fizyko-chemicznych, termicznych i biologicznych, w tym chromatografię wykluczania (żelową)(GPC), dynamiczną analizę mechaniczną właściwości lepkosprężystych (DMA), różnicową kalorymetrię skaningową (DSC), skaningową mikroskopię elektronową (SEM), szerokokątowe rozpraszanie promieniowania X (WAXS), analizę właściwości powierzchniowych metodą osadzonej kropli i testy cytotoksyczności *in vitro* z wykorzystaniem komórek fibroblastów linii L929 i ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych/stromalnych pochodzących ze szpiku kostnego (hBM-MSCs).

Doktorantka przeprowadziła również badania degradacji hydrolitycznej wybranych materiałów w buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (PBS) w temperaturze 37 °C. Kluczowymi analizami były testy wstrzykiwalności wykonane na specjalnie skonstruowanej przystawce do maszyny wytrzymałościowej. Uzyskane wyniki pozwoliły na ilościowe określenie siły, jaka jest niezbędna do wyciśnięcia ze strzykawki materiału kompozytowego.

Doktorantka w sposób bardzo umiejętny dobrała techniki badawcze, co wskazuje na Jej bardzo dobre poruszanie się w przedmiocie rozprawy. Co więcej, zastosowane metody badawcze wskazują na interdyscyplinarny charakter pracy doktorskiej Doktorantki.

Podsumowując, należy stwierdzić, że zastosowane techniki eksperymentalne i metody badawcze zostały dobrane w sposób trafny i odzwierciedlający bardzo bogaty, eksperymentatorski charakter pracy doktorskiej.

Elementy nowości w pracy

Wytwarzanie termowrażliwych hydrożeli polimerowych o potencjalnym wykorzystaniu jako rusztowania w inżynierii tkankowej jest dosyć dobrze poznanym obszarem badawczym, choć sukcesy aplikacji takich produktów w praktyce klinicznej są wciąż niezbyt liczne. Dlatego Doktorantka zwróciła uwagę na kompozyty hydrożelowe, które zawierają dodatki w postaci cienkich (nanometrycznych) bioaktywnych włókien, i kombinacja których w połączeniu z termowrażliwymi hydrożelami na podstawie metylocelulozy i agarozy, nie była wcześniej opisana w literaturze. Doktorantka przeprowadziła nowatorskie badania, których wyniki zostały opublikowane w 5 oryginalnych publikacjach, w takich czasopismach jak *Polymers* (2019, 2022), *Micron* (2021) oraz *RCS Advances* (2022, 2023). Ważną bazą dla przeprowadzonych prac badawczych były dwie publikacje przeglądowe, które ukazały się w czasopismach *J. Neural Eng.* (2018) i *Polymers* (2020).

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka wykazała, że metyloceluloza wykazuje odwracalne, kompleksowe sieciowanie termiczne w szerokim zakresie stężeń, wynikające z natury niższej temperatury krytycznej roztworu (LCST). Doktorantka zaobserwowała nieopisane wcześniej w literaturze efekty cieplne, które przypisała oddziaływaniom molekularnym metylocelulozy w rozpuszczalniku oraz które towarzyszą zmianom w oddziaływaniach polimer—rozpuszczalnik i polimer—polimer.

Na podstawie badań właściwości lepkością i biologicznych, Doktorantka wyznaczyła również optymalny zakres stężeń metylocelulozy (2-5% wag.), które zostały wybrane do dalszych, bardziej zaawansowanych badań biokompatybilności.

Ważnym osiągnięciem Doktorantki było również wykazanie, że przeprowadzenie fragmentacji ultradźwiękowej nanowłókien PLLA wytworzonych w procesie elektroprzędzenia, nie wpływa na wielkość mas cząsteczkowych oraz ich dyspersyjność na podstawie wyników GPC. Wyniki wskazują, że procesy te nie prowadzą do degradacji polimeru. Przeprowadziła funkcjonalizację krótkich elektroprzędzonych włókien PLLA za pomocą lamininy, stosując uprzednio obróbkę etanolem, w wyniku czego powstały bioaktywne włókna. Ponadto, na podstawie przeprowadzonych badań lepkości układu hydrożelowego, zarówno natywnego, jak i napełnionego włóknami PLLA, Doktorantka wykazała stabilność hydrożelu i niewielki wzrost lepkości po dodaniu włókien, umożliwiając wstrzykiwanie za pomocą igły 22G.

Kolejnym osiągnięciem Doktorantki było wykazanie efektu inicjowania sieciowania metylocelulozy poprzez zastosowanie dodatku agarozy, manifestujące się szybszym sieciowaniem i polepszonymi właściwościami lepkością układu hydrożelowego. Dodatkowo, dodatek agarozy poprawił adhezję komórek w wybranych wariantach hydrożelowych.

Finalnie, Doktorantka wykazała zdolność do wstrzykiwania uzyskanych materiałów kompozytowych, którą oszacowała na podstawie siły potrzebnej do wyciśnięcia roztworu wynoszącej nie mniej niż 30 N w przypadku wykonywania wstrzyknięcia przez igłę 23 G.

Uwagi dyskusyjne

Przedstawiona do recenzji praca zawiera bogaty materiał eksperymentalny, który posłużył do realizacji głównego celu pracy, jakim było zaprojektowanie wstrzykiwalnego i termoczułego systemu hydrożelowego napełnionego krótkimi włóknami polimerowymi, który mógłby służyć jako rusztowanie do zastosowań w inżynierii tkankowej. Założeniem było dobranie takiego składu i procesu wytwarzania aby powstały materiał zapewniał nie tylko wstrzykiwalność i sieciowanie *in situ* po wstrzyknięciu, ale także naśladował ECM. Doktorantka zajęła się dobraniem odpowiednich składników, ich stężeń i proporcji, procesu wytwarzania i jego parametrów, a także metod oceny właściwości materiałów. Dyskusja uzyskanych wyników badań i wnioski są dobrze sformułowane i w pełni odzwierciedlają bogactwo materiału doświadczalnego zawartego w pracy.

Przedstawiona do oceny rozprawa ma formę autoreferatu podsumowującego 7 prac wchodzących w cykl publikacyjny, z których dwie stanowią prace przeglądowe. W pracy brakuje streszczenia w języku polskim i jest to dosyć ważne uchybienie formalne, gdyż wymóg takiego streszczenia określa Ustawa z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, art. 187, p.4. Brakuje również spisu symboli i skrótów, które znacząco ułatwiłoby poruszanie się po przygotowanym opracowaniu.

Doktorantka wykorzystała metodę DSC do zbadania procesu termozelowania metylocelulozy oraz materiałów kompozytowych. Na ile warunki pomiarów (szybkość grzania/chłodzenia) mają wpływ na pojawienie się konkretnej przemiany, a jaki wpływ

mają parametry fizyko-chemiczne hydrożelu? Pytanie ma charakter dyskusyjny i nie umniejsza walorom poznawczym przedstawionym w dysertacji, opartej na recenzowanych już publikacjach.

Podsumowując stwierdzam, że nie wnoszę zasadniczych uwag do interpretacji wyników i sposobu przeprowadzenia badań.

Wnioski końcowe

Doktorantka zrealizowała bardzo obszerny program badań eksperymentalnych, uzyskując interesujące wyniki o niepodważalnych znamionach nowości naukowej. Praca wnosi cenny wkład w aspekty poznawcze dotyczące zagadnień z obszaru inżynierii materiałów hydrożelowych i kompozytów zawierających krótkie struktury włókniste dla potrzeb inżynierii tkankowej. Doktorantka wykazała, że możliwe jest uzyskanie termoczułego i wstrzykiwalnego kompozytu hydrożelowego wykonanego z wodnego roztworu metylocelulozy i agarozy wzmocnionego krótkimi włóknami PLLA, otrzymanymi metodą elektroprzędzenia i ultradźwięków oraz funkcjonalizowanymi lamininą.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że Kandydatka do stopnia doktora nauk inżynieryjno-technicznych jest współautorem siedmiu artykułów opublikowanych w indeksowanych czasopismach, będąc pierwszym Autorem we wszystkich. W dorobku Doktorantki znajduje się sumarycznie 10 publikacji, które były cytowane ponad 160 razy, a współczynnik $h=6$.

Biorąc pod uwagę osiągnięte wyniki, stwierdzam iż przedłożona do recenzji praca doktorska mgr inż. Beaty Niemczyk-Soczyńskiej spełnia warunki przewidziane ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (art. 187, Dz.U. z 2022 r., poz. 574, z późn. zm.). Dlatego wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Beaty Niemczyk-Soczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony.

Ponadto, biorąc pod uwagę, że (i) recenzowana praca dostarcza nowych i wartościowych informacji na temat procesu sieciowania metylocelulozy oraz korzystnego wpływu dodatku agarozy na szybkość sieciowania metylocelulozy, właściwości mechaniczne i interakcje komórka-materiał, (ii) wskazuje na możliwości praktycznego wykorzystania wytworzonych materiałów w inżynierii tkankowej lub jako modele 3D dla hodowli komórkowych guza mózgu w projektowaniu innowacyjnych terapii przeciwnowotworowych oraz (iii) udowadnia, że Doktorantka porusza się ze swobodą w wykorzystaniu różnych narzędzi badawczych stosowanych nie tylko w inżynierii materiałowej, ale i w naukach chemicznych i biologicznych, wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr inż. Beaty Niemczyk-Soczyńskiej.



Szczecin, 12.09.2023 r.