

## Wydział Inżynierii Metali i Informatyki Przemysłowej

KATEDRA METALOZNAWSTWA I METALURGII PROSZKÓW  
Centrum Mikroskopii Elektronowej dla Inżynierii Materiałowej

Prof. dr hab. inż. Urszula Stachewicz  
Tel. +48 12 617 52 30;  
e-mail: [ustachew@agh.edu.pl](mailto:ustachew@agh.edu.pl)  
website: <http://biocom4saven.agh.edu.pl/>

Kraków, 7 września 2023 r.

### Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Beaty Niemczyk-Soczyńskiej

#### **„Termowrażliwe hydrożele napelniane bioaktywnymi nanowłóknami jako rusztowania dla inżynierii tkankowej”**

wykonanej w Instytucie Podstawowych Problemów Techniki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, w Samodzielnej Pracowni Polimerów i Biomateriałów pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Pawła Ł. Sajkiewicza i promotora pomocniczego dr inż. Arkadiusza Gradysa.

#### 1. Charakterystyka pracy doktorskiej

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Beaty Niemczyk-Soczyńskiej zawiera badania nad wstrzykiwanymi hydrożelami wypełnionymi krótkimi bioaktywnymi elektroprzędzonymi nanowłóknami jako rusztowania dla inżynierii tkankowej.

Celem pracy było zaprojektowanie wstrzykiwanego termowrażliwego systemu hydrożelowego wypełnionego krótkimi włóknami, który mógłby służyć jako rusztowanie do zastosowań w inżynierii tkankowej. Po wstrzyknięciu materiał powinien tworzyć sieć przypominającą macierz pozakomórkową. W związku z powyższym, zostały ustalone poniższe zadania:

1. Zbadanie i analiza hydrożelu metylocelulozy (MC) przy różnych stężeniach roztworu w celu wybrania optymalnych stężeń hydrożelu MC z punktu widzenia szybkości sieciowania, właściwości lepkosprężystych i odpowiedzi komórkowej.
2. Systematyczne badania różnych stężeń i proporcji roztworów MC i agarozy (AGR) oraz dobór optymalnych proporcji układów MC/AGR. Scharakteryzowanie układu hydrożelowego pod względem efektów termicznych, szybkości sieciowania, właściwości lepkosprężystych, a także biokompatybilności.
3. Elektroprzędzenie nanowłókien z poli-L-laktydu (PLLA), ich ultradźwiękowa fragmentacja, a następnie funkcjonalizacja nanowłókien lamininą. Charakterystyka otrzymanych pociętych nanowłókien pod względem struktury, zwilżalności, ilości unieruchomionego białka oraz dystrybucji w roztworze hydrożelu.
4. Optymalizacja proporcji, czyli stężeń i udziałów w roztworze, to jest: pomiędzy poszczególnymi składnikami hydrożelu MC i AGR, a także ilości dodanych krótkich nanowłókien z PLLA, w celu uzyskania wstrzykiwalnego materiału o odpowiedniej strukturze, naśladującego macierz pozakomórkową, do zastosowań w inżynierii tkankowej i trójwymiarowych modelach hodowli nowotworów. Dodatkowo, celem było scharakteryzowanie kompozytu pod względem lepkości, zdolności do wstrzykiwania oraz właściwości biologicznych.

Autorka postawiła następującą hipotezę naukową: istnieje optymalny skład chemiczny i proces wytwarzania, który pozwoli uzyskać inteligentny, termowrażliwy, wstrzykiwany hydrożel z roztworu MC/AGR, z dodatkiem krótkich włókien elektroprzędzonych z PLLA modyfikowanych lamininą, które dobrze naśladują macierz pozakomórkową.

Rozprawa doktorska obejmuje 42 strony części opisowej oraz 7 artykułów naukowych. Część opisowa składa się z 8 rozdziałów: wprowadzenie z przeglądem literatury, cele pracy i hipotezę, materiały i metody eksperymentalne, wyniki badań wraz z dyskusją, streszczenie artykułów naukowych i wnioski oraz bibliografię zawierającą 51 pozycji. Dodatkowo został dołączony do pracy dorobek naukowy kandydatki na doktora w formie CV, wykaz publikacji, raport z badania antyplagiatowego pracy i załącznik opisujący m.in. efekty kształcenia ze studiów doktoranckich. Opublikowane artykuły naukowe i oświadczenia współautorskie zostały także dołączone do pracy.

Na pracę składają się następujące publikacje:

1. Niemczyk B., Sajkiewicz P., Kołbuk D., *Injectable hydrogels as novel materials for central nervous system regeneration*, **Journal of Neural Engineering**, Vol.15, No.5, pp.051002-1-15, 2018.
2. Niemczyk-Soczyńska B., Gradys A., Kołbuk D., Krzton-Maziopa A., Sajkiewicz P., *Crosslinking kinetics of methylcellulose aqueous solution and its potential as a scaffold for tissue engineering*, **Polymers**, Vol.11, No.11, pp.1772-1-17, 2019.
3. Niemczyk-Soczyńska B., Gradys A., Sajkiewicz P., *Hydrophilic surface functionalization of electrospun nanofibrous scaffolds in tissue engineering*, **Polymers**, Vol.12, No.11, pp.2636-1- 20, 2020.
4. Niemczyk-Soczyńska B., Dulnik J., Jeznach O., Kołbuk D., Sajkiewicz P., *Shortening of electrospun PLLA fibers by ultrasonication*, **Micron**, Vol.145, pp.103066-1-8, 2021.
5. Niemczyk-Soczyńska B., Sajkiewicz P., Gradys A., *Toward a Better Understanding of the Gelation Mechanism of Methylcellulose via Systematic DSC Studies*, **Polymers**, Vol.14, No.9, pp.1810-1-13, 2022.
6. Niemczyk-Soczyńska B., Gradys A., Kołbuk D., Krzton-Maziopa A., Rogujski P., Stanaszek L., Lukomska B., Sajkiewicz P., *A methylcellulose/agarose hydrogel as an innovative scaffold for tissue engineering*, **RSC Advances**, Vol.12, No.41, pp.26882-26894, 2022.
7. Niemczyk-Soczyńska B., Kołbuk D., Mikułowski G., Ciechomska I., Sajkiewicz P., *Methylcellulose/agarose hydrogel loaded with short electrospun PLLA/laminin fibers as injectable scaffold for tissue engineering/3D cell culture model for tumour therapies*, **RSC Advances**, Vol. 13, No.18, pp. pp.11889-11902, 2023.

Doktorantka umieściła streszczenie pracy w języku angielskim i streszczenie artykułów, które jednakże nie zawierają najważniejszych rysunków. Całość pracy bazuje na wyżej wymienionych 7 publikacjach, gdzie są przedstawione wszystkie wyniki badań do doktoratu wraz z dwa przeglądami literatury w następujących tematach:

- wstrzykiwane hydrożele jako nowatorskie materiały do regeneracji centralnego układu nerwowego – publikacja nr 1, na bazie 143 artykułów;
- funkcjonalizacja hydrofilowych powierzchni elektroprzędzonych nanowłókien do zastosowań jako rusztowania w inżynierii tkankowej– publikacja nr 3, na bazie 111 artykułów.

We wstępie zostały opisane użyte materiały, metoda elektroprzędzenia PLLA i ogólnie metody charakteryzacji jakie zastosowała w swojej pracy badawczej Doktorantka. Opis obejmuje następujące metody:

- Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)
- Dynamiczna analiza mechaniczna (DMA)
- Testy biokompatybilności
- Testy degradacji materiałów

- Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)
- Szerokokątowa dyfrakcja rentgenowska (WAXS)
- Chromatografia żelowa (GPC)
- Pomiar kąta zwilżania
- Badanie ścieralności metodą BCA
- Pomiary wstrzykiwalności i lepkości materiału

W mojej ocenie zakres przeglądu literatury głównie w postaci dwóch artykułów przeglądowych został dobrany trafnie i rzetelnie przedstawiony, w związku z czym Doktorantka jasno sformułowała cele pracy i zaplanowała badania eksperymentalne. W części doświadczalnej w rozdziale 4 zostały opisane publikacje składające się na główną część pracy doktorskiej, które zostały już wcześniej wymienione.

## 2. Ocena pracy

Badania zostały przeprowadzone w sposób systematyczny i staranny. Zaletą pracy jest podjęcie bardzo ciekawej tematyki pracy, której celem było opracowanie termowrażliwego i wstrzykiwanego systemu hydrożelowego wypełnionego krótkimi włóknami do zastosowania w inżynierii tkankowej jako rusztowania.

Mimo że praca składa się z cyklu 7 opublikowanych artykułów, które zostały poddane procesowi recenzji, chciałabym zwrócić uwagę na kilka punktów do dyskusji, zwłaszcza do prac, w których autorka opisuje swoje wyniki badań.

### Publikacja 2

1. Jakie były parametry obrazowania próbek w sekcji 'cell morphology'?
2. Na rysunku 10 zostały przedstawione wyniki proliferacji testem *Presto Blue*, nie ma jednak informacji o analizie statystycznej w opisie rysunku i na wykresie.
3. Pytanie odnośnie sformułowania dyskusji wyników z testów biokompatybilności, strona 13 w artykule: sekcja 3.3. Biological Test: „*At the higher MC concentrations, the metabolic viability was rather low (Figure 10)*”  
W późniejszej części dyskusji pojawia się wzmianka o toksycznym działaniu hydrożeli przy stężeniach MC powyżej 5% i braku kontroli pH roztworów. Czy Doktorantka może podzielić się szerszym wyjaśnieniem takich wyników lub porównaniem do wyników w literaturze. Dlaczego występuje takie zachowanie komórek? Czy wcześniej takie efekty hydrożeli na komórki były obserwowane?
4. Jak wyglądają wyniki testów proliferacji dłuższe niż 3 dni, czy wówczas niższe stężenie MC ma też toksyczny efekt na komórki?



#### Publikacja 4

5. Podobnie jak w publikacji 2 nie ma podanych parametrów obrazowania SEM. Parametry obrazowania wpływają na jakość otrzymanych mikrografii i ich późniejszą interpretację. Proszę przynajmniej podać tzw. '*working distance*' i zastosowane napięcie przyspieszające przy obrazowaniu.
6. Jak wyglądał dokładnie proces filtracji krótkich włókien i w jakich warunkach był przeprowadzony?
7. Czy były robione pomiary średnic nanowłókien PLLA po ultradźwiękach? Jeśli tak, to czy proces ten wpływał na zmianę ich średnicy?
8. Z wyników WAXS wynika że krótkie włókna mają inną strukturę niż przed procesem ich ciecienia ultradźwiękami. Czy wynika z tego że mamy do czynienia z całkowicie innym materiałem niż wyjściowy PLLA zastosowany do produkcji włókien?
9. Czy były robione analizy DSC ciągłych i krótkich włókien z PLLA?

#### Publikacja 6:

10. Jak otrzymane wyniki biokompatybilności można porównać do wcześniejszych wyników badań z komórkami w publikacji 2 (próbki bez agarozy)? Porównanie tych wyników byłoby ciekawe z punktu widzenia tej pracy doktorskiej jako całościowy w rozwój nauki.
11. *Rysunek 2* dlaczego punkty są łączone i dlaczego są to linie proste między 2 punktami, czy jest to zależność liniowa jaką Autorka chce pokazać?
12. *Rysunek 7* czy była wykonana kontrola dla próbki MC – w charakteryzacji materiały pojawiają się wyniki dla samego MC a jednak nie ma przedstawionych wyników dla odpowiedniego testu proliferacji.
13. Przy jakim stężeniu MC zostały zrobione testy proliferacji?
14. *Rysunki 8 i 10* - jaka jest grubość wizualizacji w 3D, jaki był *z-stack* w czasie obrazowania? Przydałby się taka informacja w opisie rysunku.

#### Publikacja 7:

15. Ile zostało wykonanych pomiarów katów zwilżania i jak został policzony błąd? Jaki rodzaj wody został zastosowany w eksperymencie?
16. *Rysunek 2* brak dodania oznaczeń a), b) ... i dokładniejszego opisu rysunku.
17. W dyskusji na stronie 11899, pod koniec 2 kolumny została wspomniana '*Johnson–Kendall–Roberts (JKR) theory*'. W jaki sposób teoria dotycząca

utworzenia kontaktu między dwoma sprężystymi kulami ma zastosowanie do połączeń komórki z hydrożelem? Czy nie pomija się w ten sposób oddziaływania elektrostatycznego między komórką a podłożem?

Dodatkowo ogólne uwagi do pracy:

18. Czy wnioski końcowe z całości pracy mogłyby być bardziej rozwinięte. Czuje się niedosyt czytając je skumulowane w 3 punktach. Poza tym punkt 3c wydaje się być powtórzonym częściowo punktem 1.
19. Wnioski w publikacjach są o wiele obszerniejsze i nie mają przełożenia na wnioski końcowe pracy.
20. Jedno zdanie nie powinno być osobnym akapitem, przykład strona 7 pracy.
21. Dodanie streszczenia pracy w języku polskim i wykazu użytych symboli oraz akronimów byłoby przydatne.

Uwagi o charakterze dyskusyjnym i uwagi redakcyjne zawarte w tej recenzji nie wpływają na pozytywną ocenę pracy. Są one wskazówkami przydanymi w dalszym rozwoju naukowo-badawczym Doktorantki.

### 3. Ocena końcowa pracy

Po zapoznaniu się z pracą doktorską i przeanalizowaniu wyników stwierdzam, że cele badawcze zostały bardzo dobrze opisane i rozważone. Praca ta jest świetnym przykładem interdyscyplinarnych badań obejmujących metody wywarzania rusztowań i ich modyfikacji oraz ich charakteryzacji połączonych z odpowiedziami biologicznymi komórek. Imponujące jest to że jest to doktorat na bazie 7 publikacji. Z tego względu praca powinna zostać wyróżniona, ponieważ dotyczy niezwykle ważnych tematów potencjalnie prowadzących do komercyjnych zastosowań.

Praca Pani mgr inż. Beaty Niemczyk-Soczyńskiej „Termowrażliwe hydrożele napelniane bioaktywnymi nanowłóknami jako rusztowania dla inżynierii tkankowej zawiera wartościowe wyniki badań i ich dyskusję. Według mojej opinii praca ta spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim, określone ustawą o stopniach i tytułach naukowych. Wnioskuje do Rady Instytutu Podstawowych Problemów Techniki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o przyjęcie rozprawy doktorskiej i o dopuszczenie Mgr inż. Beatę Niemczyk-Soczyńską do publicznej obrony.

  
Urszula Stachewicz