

Warszawa, 09.01.2013

Dr hab. inż. Wojciech Świąszkowski
Wydział Inżynierii Materiałowej
Politechnika Warszawska

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Doroty Kołbuk

pt.: Wpływ warunków elektroprzewodzenia na strukturę i właściwości jedno- i dwuskładnikowych nanowłókien polimerowych stosowanych w inżynierii tkankowej

1. Tematyka rozprawy

Wraz z rozwojem nanotechnologii pojawiły się możliwości wywarzania i charakteryzowania włókien o bardzo małych średnicach - wyrażonych w nanometrach, które nazywamy nanowłóknami. Nanowłókna w porównaniu do włókien standardowych mają zasadniczo różne właściwości, przede wszystkim ze względu na duży stosunek powierzchni do masy, co daje dużą powierzchnię właściwą i zapewnia doskonałe właściwości mechaniczne. Inna też jest reakcja komórek biologicznych na kontakt z elementami struktury o rozmiarach nanometrycznych, a także zwilżalność nanowłókien przez różne ciecze.

W ostatnich latach, coraz więcej badań prowadzonych jest w kierunku poszukiwań innowacyjnych zastosowań nanowłókien polimerowych, które znajdują szerokie zastosowanie zarówno w medycynie, biotechnologii jak i inżynierii. Stosowane są jako materiały na rusztowania do regeneracji tkanek i systemy dostarczania leków, oraz materiały opatrunkowe. Wytwarza się z nich różnego rodzaju filtry i membrany np. filtry wodne, filtry antybakteryjne. Znalazły również potencjalne aplikacje jako materiały na odzież ochronną, czy też sensory do wykrywania toksycznych gazów.

Niniejsza praca dotyczy zastosowania nanowłókien w inżynierii tkankowej. Inżynieria tkankowa niesie nowe możliwości w zakresie wspomagania procesów naprawczych tkanek i narządów człowieka. Znaczącą rolę w inżynierii tkankowej odgrywają rusztowania tkankowe. Są to porowate implanty wykonane przeważnie z materiałów biodegradowalnych, które zasiedlone komórkami, wszczepiane są w miejsce ubytku

tkanki. Mają pełnić rolę sztucznej macierzy pozakomórkowej (ECM) zanim komórki nie wytworzą właściwej, naturalnej substancji międzykomórkowej. Większość wytwarzanych rusztowań tkankowych posiada strukturę mikrometryczną, jednak główne składniki ECM naszych tkanek tj. kolagen są włóknami o nanometrycznych rozmiarach. Spostrzeżenie to przyczyniło się do intensyfikacji badań nad rusztowaniami tkankowymi o trójwymiarowej strukturze nanometrycznej, w celu odtwarzania budowy macierzy pozakomórkowej.

Jedną z najefektywniejszych metod wytwarzania podobnych do biologicznych struktur trójwymiarowych jest metoda elektroprzędzenia. Elektroprzędzenie jest procesem otrzymywania włókien ze stopionych polimerów lub ich roztworów z wykorzystaniem pola elektrycznego. W szczególności elektroprzędzenie z roztworu okazują się być najbardziej popularną metodą umożliwiającą wytwarzanie z różnych materiałów polimerowych nanowłóknin o kontrolowanej morfologii, geometrii i ułożeniu włókien.

Mimo, że stanowisko do elektroprzędzenia jest dość proste (źródło wysokiego napięcia, podajnik roztworu polimerowego – najczęściej strzykawka zakończona igłą, pompa, i kolektor), wytwarzanie włókien o żądanych parametrach sprawia trudności, ze względu na szereg czynników wpływających na proces formowania się nano-objektów w wysokim polu elektrycznym.

Spośród tych czynników można wyróżnić właściwości roztworu polimerowego (np. masa cząsteczkowa, lepkość, przewodność), parametry procesu (napięcie, odległość dyszy od kolektora) lub warunki zewnętrzne tj. temperatura, wilgotność. Morfologia uzyskiwanych włókien jest funkcją wielu parametrów. Zły ich dobór skutkuje tworzeniem się włókien z tzw. koralikami, włókien posiadających pory, lub wstążek zamiast włókien. Sterując parametrami procesu można otrzymać włókna mikrometryczne, sub-mikrometryczne ale także włókna o średnicach rzędu pojedynczych nanometrów. Dzięki zaś odpowiedniemu zaprojektowaniu kolektora możliwe jest otrzymanie różnego ułożenia włókien we włókninie. Na typowym płaskim odbiorniku w postaci płyty powstająca włóknina ma nieuporządkowane włókna. Zastosowanie obracającego się kolektora wspomaga uzyskiwanie zorientowanych, ukierunkowanych włókien.

Oprócz wpływu na parametry geometryczne włókien, istotne są również zmiany jakie wywołuje proces elektroprzędzenia w samym polimerze. W trakcie wyciągania strugi roztworu polimerowego może następować orientowanie i porządkowanie jego

cząsteczek. Zmieni się jego struktura nadmolekularna, stopień krystaliczności czy orientacja molekularna włókien. Tym samym zmianie ulegną jego właściwości funkcjonalne i biologiczne. Jednak prac na ten temat w literaturze jest niewiele.

W szczególności brak jest szerszych doniesień na temat ilościowej oceny wpływu elektropiędzenia na orientację molekularną włókien wykonanych z poliestru alifatycznego jakim jest poli(e-kaprolakton). Jest to obiecujący materiał na rusztowanie tkankowe ulegający powolniej hydrolizie w organizmie człowieka. Jedną z wad tego materiału jest jego duża hydrofobowość. Dlatego w wielu pracach próbuje się obniżyć tą hydrofobowość poprzez zastosowanie dodatku w postaci biopolimeru tj. kolagenu czy żelatyny tworząc włókniny dwuskładnikowe.

Istotne jest więc określenie wpływu parametrów procesu elektropiędzenia zarówno na morfologię jak i na strukturę nadmolekularną nanowłókien z czystego PCL lub PCL z dodatkiem kolagenu lub żelatyny.

W świetle tych rozważań można stwierdzić, że tematyka pracy bardzo dobrze wpisuje się w obecne trendy badań naukowych, których celem jest wytwarzanie z zastosowaniem procesu elektropiędzenia optymalnych nanowłókien polimerowych na rusztowania komórkowe dla inżynierii tkankowej.

2. Struktura, cel i zakres pracy

Recenzowana praca napisana jest w języku polskim. Praca jest obszerna i liczy 135 stron. Składa się z 5 głównych rozdziałów, które są podzielone na kilka podrozdziałów. Zakończona jest bogatą bibliografią, zawierającą 168 pozycji literaturowych, ściśle związanych z tematyką rozprawy. Praca jest bogata w ilustracje. Zawiera 93 rysunki oraz 13 tabel. Układ pracy jest poprawny i logiczny, zachowujący właściwą proporcję części wprowadzającej do tematu i części badań własnych Autorki.

Rozdział I, Wprowadzenie, opisuje genezę pracy oraz jest streszczeniem najistotniejszych treści, które zawierają kolejne rozdziały pracy.

Rozdział II zawiera stan wiedzy w tematyce rozprawy na podstawie przeglądu literaturowego. Autorka w sposób właściwy przedstawia dotychczasowe osiągnięcia w zakresie inżynierii tkankowej, funkcji naturalnej i sztucznej macierzy pozakomórkowej oraz interakcji komórka-rusztowanie komórkowe. Wskazuje również obecne kierunki rozwoju materiałów polimerowych, podkreślając zasadność prowadzenia prac badawczych nad syntetycznymi i naturalnymi polimerami

biodegradowalnymi, w celu zastosowania ich w inżynierii tkankowej. Charakteryzuje również proces elektroprzędzenia jako jedną z najbardziej wydajnych metod wytwarzania nanowłókien. W szczególności analizuje parametry procesu wpływające na jakość otrzymywanych nano-objektów. Podkreśla również, że barak jest ilościowych wyników wpływu elektroprzędzenia na strukturę molekularną i nadmolekularną przetwarzanych tą metodą polimerów.

W kolejnym rozdziale Autorka definiuje główne 2 cele pracy oraz zakres badań. Pierwszym celem pracy było (s.48 cytata) *„określenie parametrów procesu elektroprzędzenia mających istotny wpływ na morfologię oraz strukturę nadmolekularną włókien jednoskładnikowych”*. Drugim, definiowany przez Autorkę celem nadrzędnym, było (s.48 cytata) *„określenie wpływu dodatku biopolimeru na morfologię, hydrofobowość oraz strukturę molekularną oraz nadmolekularną włókien dwuskładnikowych w kontekście funkcjonalności włókien w badaniach in vitro”*.

Cele pracy sformułowano poprawnie. W pracy nie postawiono żadnej tezy.

Rozdział IV zawiera opis części doświadczalnej. Autorka opisuje użyte materiały (PCL, żelatyna, kolagen, kilka rozpuszczalników) oraz zastosowaną metodę formowania włókien jedno i dwuskładnikowych o dwóch różnych ułożeniach włókien ukierunkowanych i nieukierunkowanych. Do wytwarzania nanowłókien jednoskładnikowych z PCL oraz dwuskładnikowych PCL z żelatyną lub kolagenem zastosowała elektroprzędzenia o różnych parametrach procesu. Użyła różnych rodzajów rozpuszczalników. Stosowała różne stężenia i szybkości przepływu przędzonego roztworu oraz różne napięcia pola elektrycznego. Na podkreślenie zasługuje zaproponowana i zrealizowana metodyka badań otrzymanych włókien. Obejmowała szeroki program badań, m.in. szczegółowe badania morfologii, struktury molekularnej i nadmolekularnej, oraz właściwości fizyko-chemicznych i biologicznych. Morfologię włókien określono z zastosowaniem skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM); strukturę molekularną – spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) oraz rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (XPS); hydrofobowość za pomocą pomiaru kąta zwilżania; strukturę nadmolekularną metodami różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC), szerokokątowej dyfrakcji rentgenowskiej (WAXS) oraz polaryzacyjno-referencyjnego mikroskopu optycznego (MPI); moduł sprężystości w klasycznej próbie rozciągania. Badania biologiczne obejmowały ocenę cytotoksyczności z zastosowaniem

typowych do tego celu komórek fibroblastów mysich 3T3, oraz badania morfologii i proliferacji ludzkich komórek mezenchymalnych macierzystych MSC.

W kolejnym podrozdziale Autorka prezentuje wyniki przeprowadzonych badań dla jedno i dwuskładnikowych włókien wraz z ich szczegółową dyskusją i podsumowaniem. Przeprowadzone badania pozwoliły Autorce na sformułowanie najważniejszych wniosków końcowych, które zamieściła w rozdziale V pracy.

3. Ocena merytoryczna i uwagi krytyczne

Jak już wcześniej nadmieniono tematyka rozprawy jest aktualna i ważna, zarówno z punktu widzenia zdobywania nowej wiedzy jak i praktycznego zastosowania wyników badań. Znakomicie wpisuje się w nowoczesne kierunki badań w obszarach nanotechnologii, inżynierii biomateriałów i inżynierii tkankowej.

Bardzo ambitny program badań został w pełni zrealizowany. Autorka wykazała się wiedzą i umiejętnościami zarówno w zakresie wytwarzania jedno i dwuskładnikowych materiałów nanowłóknistych jak i ich dokładnej charakteryzacji z zastosowaniem zawansowanych technik badawczych, co podnosi znacząco poziom naukowy rozprawy. Stosując szeroki wachlarz badań, Autorka scharakteryzowała morfologię, strukturę molekularną i nadmolekularną, właściwości hydrofilowe i mechaniczne uzyskanych materiałów polimerowych wytwarzanych w różnych warunkach procesu elektroprzędzenia. Przeprowadziła ocenę wpływu parametrów procesu na morfologię i strukturę nanowłókien co ze względu na złożoność procesu jak też silne powiązania pomiędzy jego parametrami jest bardzo złożonym problemem. Tym samym zrealizowała pierwszy cel pracy. Na podstawie tych badań sformułowała interesujące wnioski. Stwierdziła, np. że (str. 81. cyt.) „*parametry aparaturowe tj. przyłożone napięcie nie wpływają tak silnie jak parametry roztworu na morfologię nanowłókien*”. Wykazała również, że na morfologię i strukturę nadmolekularną ma także wpływ rodzaj kolektora. Włókna zbierane na obracającym się bębnie cechowały się wyższym stopniem krystaliczności i orientacją molekularną niż włókna zbierane na nieruchomej płycie. Badania stopnia orientacji molekularnej oraz próba oceny ilościowej czynnika orientacji molekularnej metodą oceny dwójłomności optycznej pojedynczych włókien można zaliczyć do najistotniejszych osiągnięć pracy. Istotne z punktu aplikacyjnego są również wyniki badań biologicznych. Autorka potwierdziła niski stopień adhezji oraz proliferacji komórek na czystych włóknach z PCL, wynikający z hydrofobowego charakteru tego polimeru.

Doktorantka opracowała optymalne warunki formowania jedno i dwuskładnikowych włókien zapewniające właściwą (bez obecności koralików) morfologię i odpowiedź biologiczną komórek.

Istotne spostrzeżenie stanowi wniosek, że krystaliczność i orientacja molekularna włókien dwuskładnikowych zależy od udziału biopolimeru (żelatyny lub kolagenu) oraz od sposobu odbierania włókien. Dodatek żelatyny w ilości 20% znacznie podwyższa krystaliczność oraz orientację molekularną kryształów PCL. Dodatek biopolimeru zwiększył hydrofilowość włókien. Dzięki temu jak również zawartości naturalnych polimerów włókna dwuskładnikowe korzystniej niż jednoskładnikowe wpływały na reakcję i proliferację komórek na nich hodowanych. Najkorzystniejsze warunki komórkom wypełniły włókniny z 20% dodatkiem żelatyny. Prezentowane osiągnięcia są potwierdzeniem, że Autorka zrealizowała również drugi nadrzędny, który postawiła w swojej cel pracy tj.: (cyt. str. 48) *"określenie wpływu dodatku biopolimeru na morfologię, hydrofobowość oraz strukturę nadmolekularną włókien dwuskładnikowych w kontekście funkcjonalności w badaniach in vitro."*

Do osiągnięć w pracy należy zaliczyć również próbę wyjaśnienia mechanizmu poprawy właściwości biologicznych w wyniku dodatku polimeru naturalnego do PCL, a także poparte własnymi wynikami ustosunkowanie się do dyskusji literaturowej dotyczącej zasadności stosowania kolagenu w miejsce żelatyny.

Czytając pracę nasuwają się pewne uwagi krytyczne i pytania:

- 1) Brakuje konkretnego zastosowania opracowywanych jedno i dwuskładnikowych nanowłókien. Do regeneracji jakiej tkanki otrzymane włókna mogłyby być użyte? Zdefiniowanie tkanki docelowej pozwoliłoby Autorce lepiej ocenić bioaktywność opracowanych włókien analizując np. kierunek różnicowania się MSC lub biologicznych składników naturalnych macierzy pozakomórkowych.
- 2) W pracy brakuje pełnej analizy statystycznej wyników. Autorka często podaje, że wielkości różnią się znacząco dla dwóch różnych materiałów, jednak nie podaje na jakim poziomie istotności było to wyznaczone.
- 3) Podane stwierdzenie na str.17, że czas degradacji in vivo jest dłuższy niż in vitro nie zgadza się z przyjętymi powszechnie danymi
- 4) Podana na tej samej stronie temp. topnienia dla PLLA wynosząca 65°C, jest również zaskakująca – zwykle wynosi ona ok 170°C.

- 5) Stwierdzenie ze str. 37, że w literaturze nie ma danych opisujących wpływ przykładanego napięcia na krystaliczność PCL nie jest do końca słuszne, lepiej napisać Autorka nie znalazła w literaturze danych opisujących taki wpływ.
- 6) Jaki typ kolagenu był użyty w badaniach?
- 7) Jak były przygotowywane roztwory do przędzenia – czy były one podgrzewane?
- 8) Jak były dobierane parametry procesu z tab. 3?
- 9) Proszę opisać model użyty do wyznaczenia średniej wielkości porów.
- 10) Czy włókna były po procesie elektroprzędzenia poddawane suszeniu? I czy była sprawdzana obecność rozpuszczalnika w otrzymanych włóknach?
- 11) Rozdział. 3 powinien być zatytułowany cel i zakres pracy. I zakres pracy powinien być lepiej sformułowany.
- 12) Jak udało się uzyskać jednakową grubość wszystkich włókien (0,1mm)?
- 13) Jaka była przewodność elektryczna zastosowanych roztworów z PCL? I czy ta przewodność i szybkość odparowywania rozpuszczalnika nie ma znaczącego wpływu na strukturę molekularną i nadmolekularną?
- 14) Na Rys. 38 brak jest wartości dla roztworu o stężeniu 12%.
- 15) Czy widoczny był wpływ rodzaju rozpuszczalnika na strukturę molekularną włókien PCL, krystaliczność oraz T_g i T_m ?
- 16) Autorka pisze często, że moduł Younga określa sprężystość materiału. W rzeczywistości Moduł Younga świadczy o sztywności materiału.
- 17) Czy słuszne jest zastosowanie do wyliczania wielkości porów tego samego wzoru dla włókien zbieranych na płytę i na bęben?
- 18) Brak jest korelacji pomiędzy średnią grubością włókien a porowatością Rys.62 i Rys.63.
- 19) W ilu punktach pomiarowych badano stężenie C, N, O dla poszczególnych włókien? Mała liczba punktów pomiarowych mogła się przyczynić do nieścisłych wyników na Rys. 67. Stężenie N dla PG1:1 mniejsze niż dla PG4:1.
- 20) Zaskakujący jest zerowy kąt zwilżania dla układu PG4:1. Zwykle jest to kąt >0 .

- 21) Dyskusyjny jest również wynik wzrostu krystaliczności z dodatkiem biopolimeru do PCL. Większość prac podaje, że żelatyna czy kolagenu obniża krystaliczność.
- 22) Dlaczego wyznaczony moduł Younga dla żelatyny jest $>1000\text{MPa}$ (Rys.81)?
Zwykle jest on $<100\text{MPa}$.
- 23) Jak wytłumaczyć słabszą proliferację komórek na PC4:1 w porównaniu do PG4:1 (Rys.90, Rys.91 i Rys.92)?
- 24) Na str. 114 występuje stwierdzenie dotyczące szybkości degradacji włókien mimo, że takich badań nie przeprowadzono. Badania degradacji są niezbędne jeżeli myśli się o zastosowaniu włókien w inżynierii tkankowej.
- 25) We wnioskach końcowych nie powinno być stwierdzenia, (str. 116 cyt.) „Wyznaczenie czynnika orientacji molekularnej w pojedynczym włóknie, wytworzonym metodą elektroprzędzenia, jest nieopisane dotychczas w literaturze”. Gdyż nie jest to najważniejszy wniosek z badań.

Biorąc pod uwagę stronę edytorską pracy, stwierdzam, że praca napisana jest starannie oraz poprawnie pod względem językowym. Autorka nie ustrzegła się jednak drobnych błędów np.

- na str. 7, 13 zamiast nazwy *macierz pozakomórkowa* Autorka stosuje *matryca międzykomórkowa*, zamiast *właściwości* - *własności mechanicznych* (str.13).
- podpis pod rys. 7 – powinno być: *utrata masy i masy cząsteczkowej*
- str. 19, zdanie pod tabelą – brakuje „wyznacza”
- na str. 22 jest referencja do rozdz.9, który nie istnieje w tej pracy
- str. 29 - pojęcie *ciężar cząsteczkowy* powinno być zastąpione przez *masa cząsteczkowa*
- podpis pod rys. 27 – *włókien wygrzewanych nie rozciąganych*
- str. 44 str. 45 – *przewodnictwo kontaktowe* jest lepszym stwierdzeniem niż *przewodnictwo adhezyjne*
- str. 46 – użyto *zastawania* zamiast *zastosowania*
- Rys. 54 niewłaściwa skala zamiast 1mm jest 1um.

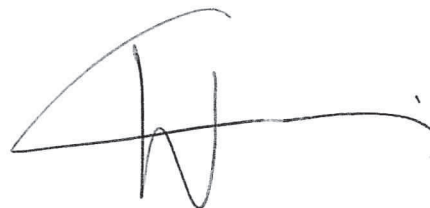
Chce podkreślić jednak, że powyższe uwagi i usterki nie obniżają mojej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej mgr inż. Doroty Kołbuk. Autorka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną oraz praktyczną z zakresu wytwarzania i charakteryzowania

nanowłókien polimerowych z polimerów syntetycznych i naturalnych. Na uwagę zasługują umiejętności Autorki dotyczące planowania i realizacji badań eksperymentalnych. Wielowątkowość problematyki badawczej wymagała od Doktorantki wykorzystania szeregu nowoczesnych metod i urządzeń badawczych (tj. SEM, FTIR, DSC, WAXS, MPI, badania mechaniczne i złożone badania biologiczne). W konsekwencji badań, zoptymalizowano proces elektroprzędzenia pod kątem wytwarzania włókien z PCL i PCL z żelatyną i kolagenem o żądanej morfologii, stopniu krystaliczności, sztywności i orientacji molekularnej, który potencjalnie może znaleźć praktyczne zastosowanie w medycynie regeneracyjnej. To jeden z elementów nowatorskich w tej pracy, który wart jest podkreślenia.

Podsumowując stwierdzam, że opiniowana rozprawa doktorska posiada wiele aspektów poznawczych i stanowi oryginalny wkład Autorki w rozwój dziedziny biomateriałów, w szczególności wytwarzania i charakteryzowania jedno i dwuskładnikowych nanowłókien polimerowych dla inżynierii tkankowej.

4. Wniosek końcowy

Uwzględniając powyższą opinię, uważam, że rozprawa Pani mgr inż. Doroty Kołbuk pt.: „Wpływ warunków elektroprzędzenia na strukturę i właściwości jedno- i dwuskładnikowych nanowłókien polimerowych stosowanych w inżynierii tkankowej”, spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim zgodnie z Ustawą o Stopniach Naukowych i Tytułach Naukowych z dnia 14.03.2003r. i może być dopuszczona do publicznej obrony.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'D' followed by a horizontal line and a small flourish at the end.