

Prof. dr hab. Leszek Jarecki
Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN
ul. Pawińskiego 5B
02-106 Warszawa

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Doroty Kołbuk
pt. „Wpływ warunków elektroprzędzenia na strukturę i właściwości jedno-
i dwuskładnikowych nanowłókien polimerowych stosowanych w inżynierii tkankowej”**

Rozprawa doktorska mgr inż. Doroty Kołbuk wykonana została pod kierunkiem promotorskim dr hab. Pawła Sajkiewicza, profesora IPPT, w Pracowni Fizyki Polimerów Zakładu Teorii Ośrodków Ciągłych IPPT PAN. Rozprawa ma charakter interdyscyplinarny i dotyczy ważnego zagadnienia kształtowania struktury nanowłókien polimerowych otrzymywanych metodą elektroprzędzenia oraz ich zastosowania jako rusztowań w hodowlach komórkowych inżynierii tkankowej. Znaczenie poznawcze rozprawy dotyczy zbadania, z zastosowaniem metod doświadczalnych, wpływu szeregu istotnych parametrów materiałowych oraz parametrów procesu elektroprzędzenia z roztworów polimerów biozgodnych i biodegradowalnych na strukturę molekularną i nadmolekularną otrzymywanych włókien oraz strukturę włóknin tych włókien z punktu widzenia ich zastosowań jako podłoża w hodowlach komórkowych. Sztuczne, biodegradowalne podłoża mają na celu tymczasowe zastąpienie włókien kolagenowych występujących w tkankach organizmów i umożliwienie prawidłowego wzrostu i proliferacji komórek tkanki, aż do wytworzenia się własnej naturalnej sieci włókien kolagenowych.

Podjęta w rozprawie tematyka oraz przeprowadzone prace badawcze wpisują się w kierunek badań aktualnie prowadzonych na świecie z powiązaniem wiedzy w zakresie nauk przyrodniczych i technicznych oraz współczesnej technologii w celu regeneracji tkanek, tworzenia biozgodnych implantów tkankowych lub wymiany uszkodzonych organów w organizmach żywych. Rozprawa doktorska mgr inż. Doroty Kołbuk poza istotnym znaczeniem poznawczym ma znaczenie praktyczne wiążące się z wykorzystaniem wyników rozprawy w inżynierii tkankowej. W związku z interdyscyplinarnym charakterem rozprawy, trudno jest mi oceniać jej część dotycząca zastosowanych metod charakteryzowania postępu hodowli komórkowych. Moja ocena rozprawy dotyczy badań kształtowania się struktury molekularnej i nadmolekularnej włókien otrzymywanych metodą elektroprzędzenia oraz wpływu struktury włókien i włóknin na charakterystyki postępu hodowli komórkowych.

Charakterystyka biograficzna.

Mgr inż. Dorota Kołbuk urodziła się w roku 1983. Studia wyższe ukończyła na Wydziale Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej w roku 2007. W tym samym roku rozpoczęła Studia Doktoranckie w IPPT PAN pod opieką naukową dr hab. Pawła Sajkiewicza. W 2006 roku przebywała na półrocznym stypendium Sokrates-Erazmus w instytucie naukowo-badawczym ILK w Dreźnie, a w roku 2010 na kilkumiesięcznym stażu dla młodych pracowników naukowych w Instytucie EMPA w St. Gallen (Szwajcaria) w ramach stypendium SCIEEX, gdzie prowadziła badania struktury i właściwości włókien w zastosowaniu do hodowli komórkowych. Od roku 2011 jest zatrudniona w Pracowni Fizyki Polimerów IPPT. W związku z interdyscyplinarnym charakterem pracy badawczej odbyła kurs w zakresie hodowli komórek na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego oraz szkolenie w zakresie rozwoju produktów innowacyjnych, badań przedklinicznych i klinicznych oraz komercjalizacji produktów biotechnologicznych. Prowadziła wykłady i prezentacje doświadczalne dla młodzieży w ramach Festiwalu Nauki zorganizowanych w IPPT.

Charakterystyka rozprawy i ocena uzyskanych wyników.

Rozprawa doktorska mgr inż. Doroty Kołbuk liczy 135 stron i składa się z pięciu rozdziałów, tj. wprowadzenia, przeglądu literatury, celu pracy, części doświadczalnej i wniosków końcowych. Rozdziały poprzedzone są streszczeniami w języku polskim i angielskim. We wprowadzeniu w sposób przejrzysty przedstawiona jest struktura pracy oraz istota podejmowanych zagadnień w poszczególnych rozdziałach, ze wskazaniem zastosowanych metod badawczych. Dość obszerny przegląd literatury, przeprowadzony na podstawie 140 pozycji literaturowych w większości z ostatnich lat, przedstawia w sposób czytelny stan wiedzy w zakresie tematyki rozprawy. Przegląd uwzględnia najważniejsze publikacje dostępne w literaturze światowej dotyczące dynamiki elektroprzędzenia włókien z roztworów polimerów, różnorodności struktury i morfologii oraz właściwości mechanicznych otrzymywanych włókien i włókniń. Przegląd literatury zakończony jest dobrze ujętym krytycznym podsumowaniem stanu wiedzy w zakresie tematu rozprawy, z którego wynika cel i zakres podjętych w rozprawie prac badawczych. Wykazana jest fragmentaryczność i niespójność danych literaturowych w zakresie morfologii, struktury i właściwości włókien polimerowych formowanych metodą elektroprzędzenia i ich funkcjonalności w hodowlach komórkowych.

Postawienie jako celu określenie parametrów elektroprzędzenia mających istotny wpływ na morfologię i strukturę włókien otrzymywanych z roztworów polimeru syntetycznego polikaprolaktanu (PCL) oraz z dodatkiem biopolimeru - żelatyny lub kolagenu ma znaczenie systematyzujące i uzupełniające wiedzę w zakresie istotnym dla zastosowań w inżynierii tkankowej. Postawione w rozprawie cele badawcze charakteryzują się oryginalnością w szeregu aspektach określania struktury nadmolekularnej otrzymywanych włókien metodą elektroprzędzenia oraz znaczenia struktury włókien i włókniń w efektywności podłoża w hodowlach komórkowych. W dotychczasowej literaturze brakowało danych określających wpływ parametrów elektroprzędzenia na stopień krystaliczności i orientację molekularną włókien oraz znaczenie tej struktury w funkcjonalności biologicznej podłoża. W tym zakresie rozprawa jest źródłem oryginalnych danych doświadczalnych i wniosków. Realizacja celu rozprawy pozwoliła na wyjaśnienie mechanizmów poprawy funkcjonalności podłoża w hodowli komórkowej, w tym na optymalizację udziału żelatyny lub kolagenu we włóknach dwuskładnikowych z PCL. Uzyskane wyniki mogą też służyć w optymalizacji efektywności podłoża formowanych na bazie innych polimerów.

Zasadniczą część rozprawy mgr inż. Doroty Kołbuk stanowi rozdział 4. „Część Doświadczalna”. Rozdział ten obejmuje charakterystykę zastosowanych polimerów i rozpuszczalników, charakterystykę istotnych właściwości roztworów używanych w elektroprzędzeniu, opis metody elektroprzędzenia, opis zastosowanych metod badawczych oraz analizę wyników badania włókien i włókniń jedno- i dwuskładnikowych otrzymywanych z roztworów o różnym stężeniu. Materiał doświadczalny rozprawy jest dość obszerny, ale zwarta i syntetyczna forma opisu wyników oraz uzyskanych wniosków sprawia, że wyniki pracy badawczej zawarte w tym rozdziale są przejrzyste, co jest szczególnie istotne wobec interdyscyplinarnego charakteru pracy.

Przedstawione są wyniki ilustrujące wpływ parametrów elektroprzędzenia z roztworów PCL i mieszaniny PCL z żelatyną lub kolagenem na strukturę molekularną, stopień krystaliczności, orientację molekularną włókien oraz topografię włókniń odbieranych na płytę i obracający się bęben. Zbadano wpływ dodatku żelatyny w różnych proporcjach do PCL w celu optymalizacji parametrów formowania z punktu widzenia funkcjonalności otrzymywanych włókniń w hodowlach komórkowych.

Badania struktury włókien i włókniń prowadzone były z wykorzystaniem aparatury badawczej w kilku ośrodkach w kraju oraz w EMPA, St. Gallen, z zastosowaniem dobrze dobranych metod eksperymentalnych. Zakres badań doświadczalnych odpowiada

postawionemu celowi rozprawy, a przedstawione wyniki badań dobrze ilustrują badane efekty. Morfologia włókien i włókniń określona jest z zastosowaniem skaningowej mikroskopii elektronowej SEM, struktura molekularna włókien metodą fourierowskiej spektroskopii w podczerwieni FTIR i rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów XPS, stopień krystaliczności metodami szerokokątowej dyfrakcji rentgenowskiej WAXS i kalorymetrii różnicowej DSC, orientacja molekularna metodą polaryzacyjno interferencyjnej mikroskopii optycznej MPI, moduł Younga włókniń z zastosowaniem maszyny wytrzymałościowej Instron.

Dobór biogodnego, biodegradowalnego poliestru syntetycznego PCL oraz biopolimerów (żelatyny i kolagenu) jest odpowiedni w kontekście postawionego celu badawczego ze względu na długi czas biodegradacji poliestru, dobre właściwości mechaniczne włókien zawierających ten polimer oraz obecność grup aminokwasów RGD w żelatynie i kolagenie, podnoszących funkcjonalność podłoża w hodowlach komórkowych. Dodatek biopolimeru podnosi właściwości hydrofilowe podłoża korzystne dla adhezji i namnażania się komórek.

Ważnym i oryginalnym wynikiem rozprawy mgr inż. Doroty Kołbuk jest stwierdzenie znaczącego wpływu stopnia krystaliczności i orientacji molekularnej włókien otrzymanych metodą elektroprzędzenia na ich funkcjonalność biologiczną w wyniku wpływu tej struktury na właściwości mechaniczne włókniń. Innym ważnym wynikiem jest wyjaśnienie w drodze systematycznych badań niektórych mechanizmów znaczącego wpływu dodatku żelatyny lub kolagenu, w tym stwierdzenie nieliniowej zależności stężenia biopolimeru na powierzchni włókien dwuskładnikowych od jej dodatku objętościowego. Efekt ten wyjaśniony jest w rozprawie w sposób wiarygodny, jako wynikający z krystalizacji PCL podczas elektroprzędzenia, która przy większej zawartości PCL wymusza migrację cząsteczek biopolimeru poza powstające krystality PCL prowadząc do wzrostu zawartości żelatyny na powierzchni włókien w przypadku 20% dodatku żelatyny. Włókniń z zawartością 20% żelatyny w PCL były najbardziej efektywnym podłożem w rozwoju hodowli komórek badanych w rozprawie. Przy tej optymalnej zawartości żelatyny stwierdzono w rozprawie zaskakujące zjawisko idealnych właściwości hydrofilowych włókniń, z zerowym kątem zwilżania, oraz obniżenie tych właściwości przy mniejszym lub większym dodatku biopolimeru. W moim przekonaniu, hydrofilowe właściwości włókniń mogą zależeć nie tylko od zawartości grup hydrofilowych żelatyny na powierzchni włókien, ale także od charakteru porowatości włókniń i związanych z tym efektów kapilarnych.

W związku ze stwierdzonym w rozprawie znaczącym wpływem wielkości i kształtu porów włókniń w efektywności biologicznej podłoża, postawiona została hipoteza, że w przypadku włókniń dwuskładnikowych z biopolimerem może następować dodatkowo wzrost ich biologicznej funkcjonalności podczas hodowli komórek wskutek wzrostu porowatości podłoża w wyniku szybszej degradacji biopolimeru.

Interesujący i oryginalny wynik rozprawy dotyczy też wykazania, że niewielki dodatek biopolimeru prowadzi do znaczącego wzrostu stopnia krystaliczności PCL we włókniach dwuskładnikowych, silniejszego od efektów orientacji molekularnej wytworzonej podczas elektroprzędzenia. Postawiona jest hipoteza, że efekt ten może wynikać z oddziaływań hydrofobowych PCL w molekularnej mieszaninie z żelatyną lub kolagenem. Podobnie, oddziaływaniami hydrofobowymi tłumaczony jest też w rozprawie obserwowany silny wpływ dodatku biopolimeru na wzrost orientacji molekularnej PCL we włókniach odbieranych na obracający się bęben oraz na wzrost modułu Younga otrzymywanych włókniń. W rozprawie analizowane są najważniejsze aspekty korelacji pomiędzy dodatkiem biopolimeru a kształtowaniem się struktury oraz morfologii włókien i włókniń otrzymywanych metodą elektroprzędzenia, w odniesieniu do włókniń włókien jednoskładnikowych PCL, z punktu widzenia ich funkcjonalności jako podłoża w inżynierii tkankowej.

Nowatorskim elementem rozprawy jest też wyznaczenie czynnika orientacji molekularnej w pojedynczych włóknach wytwarzanych metodą elektroprzędzenia, wraz z wyznaczeniem teoretycznej dwójłomności właściwej w przypadku PCL. Ta część wyników rozprawy opublikowana jest w wysoko punktowanym czasopiśmie międzynarodowym *European Polymer Journal*. Wyniki badań uzyskanych w zakresie tematu rozprawy były także przedstawione przez mgr inż. Dorotę Kołbuk na 3 konferencjach międzynarodowych i 2 konferencjach krajowych.

Wnioski końcowe sformułowane są poprawnie i mają odzwierciedlenie w uzyskanych w rozprawie wynikach prac badawczych przeprowadzonych w sposób systematyczny, zgodnie z postawionym celem badawczym. Uzyskane wyniki charakteryzują się znaczącym stopniem nowości naukowej o charakterze poznawczym i ważnych możliwościach aplikacyjnych w zakresie inżynierii tkankowej.

Uwagi krytyczne.

Uwagi krytyczne dotyczą interpretacji niektórych wyników badań, niejasności w opisie metodyki niektórych pomiarów przeprowadzonych w rozprawie oraz niedociągnięć edytorskich tekstu rozprawy.

1). Niejasna jest interpretacja wzrostu stopnia krystaliczności włókien jednoskładnikowych PCL ze wzrostem stężenia roztworu PCL (str. 69). Pominięto w niej możliwe przyspieszenie krystalizacji wskutek większej orientacji molekularnej wytworzonej podczas rozciągania strugi o większym stężeniu w procesie elektroprzędzenia, tzw. krystalizacji orientowanej. Pomiar wskazuje niewielki wzrost czynnika orientacji włókien otrzymanych z roztworów o większym stężeniu. Wzrost stopnia krystaliczności też jest niewielki, w zakresie 3-4%.

2). Zaobserwowana korelacja pomiędzy stopniem krystaliczności włókien jednoskładnikowych PCL a ich grubością nie jest odbiciem bezpośredniej zależności tych charakterystyk od siebie i interpretacja, że stopień krystaliczności grubszych włókien jest większy wskutek krystalizacji w większej masie jest w moim przekonaniu błędna (str. 81). Może to być wynik dwóch niezależnych od siebie efektów – większej grubości włókien otrzymywanych z roztworów o większym stężeniu jako efekt dynamiki procesu elektroprzędzenia oraz większego stopnia krystaliczności włókien jako efekt krystalizacji orientowanej w wyniku większej orientacji molekularnej roztworu o większym stężeniu podczas elektroprzędzenia.

3). Nie jest jasna interpretacja, że orientacja molekularna włókien zbieranych na bęben jest efektem rozciągania włókien podczas ich odbioru na obracający się bęben (str. 81). Nie wykazano w rozprawie, że takie rozciąganie ma miejsce. Większa orientacja molekularna tych włókien, w stosunku do włókien odbieranych w sposób swobodny na płytę, może wynikać z zachowania orientacji wytworzonej podczas szybkiego rozciągania strugi roztworu w procesie elektroprzędzenia i zahamowania relaksacji tej orientacji we włóknach odebranych na bęben.

4). Postawiona w rozprawie hipoteza, że obniżenie temperatury topnienia kryształów PCL we włóknach dwuskładnikowych z żelatyną wynika ze zmniejszenia rozmiarów kryształów PCL wskutek utrudnienia krystalizacji przez żelatynę (str. 96) jest mało wiarygodna i wymaga weryfikacji doświadczalnej, np. metodą niskokątowej dyfrakcji rentgenowskiej. Obserwowane w rozprawie obniżenie temperatury topnienia kryształów PCL we włóknach dwuskładnikowych może być też efektem termodynamicznym wynikającym z entropii mieszania PCL z żelatyną i obniżenia równowagowej temperatury przemiany fazowej. Przy tym rozmiary kryształów mogą być nawet większe wskutek mniejszego przechłodzenia w mieszaninie z żelatyną.

5). Niezrozumiałe jest zadanie (str. 115): „Natomiast przy większej zawartości Ge uwidacznia się dezorientujący wpływ Ge na krystaliczność”.

6). Niejasności w opisie zastosowanej metodyki pomiarów doświadczalnych:

- moduł Younga określony jest w klasycznej próbie rozciągania, ale nie podano czego, włókna czy włókniny (str. 5),
- nie podano w jaki sposób wyznaczono szybkość ścinania roztworu w igle układu elektroprzędzenia,
- ΔH^0 we wzorze (3) jest ciepłem właściwym topnienia PCL, a nie strumieniem ciepła topnienia.
- niejasne jest założenie, że czynniki orientacji fazy krystalicznej i amorficznej mają jednakową wartość (str. 56). Czynniki orientacji krystalitów we włóknach jest zwykle znacznie większy.
- w rozdziale 4.3.5 „Właściwości mechaniczne” powinno być wyraźnie określone, czego dotyczą pomiary modułu Younga, włókien czy włóknin,
- w podpisach rysunków 59, 60, 74, 87, 88, 89 i tabeli 7 brakuje wskazania techniki uzyskanych obrazów morfologii włóknin (SEM); w podpisie rys. 16a,b – wskazania metody szerokokątowej dyfrakcji rentgenowskiej (WAXS); w tabeli 12 – wskazania w przypadku jakich włóknin podano kąty zwilżania, zbieranych na bęben czy płytę.
- stopień krystaliczności na rysunku 44 podany jest błędnie w [%], co prowadzi do stukrotnego zaniżenia podanych tam wartości.

7). W tekście rozprawy występują liczne błędy literowe. Używane są sformułowania żargonowe, których mimo ich skrótowego znaczenia należałoby unikać. W tekście podane są odniesienia do błędnie podanych numerów rysunków na stronach 65, 84, 86, 96. Błędy tego typu mogą wynikać z pośpiechu przy pisaniu tekstu rozprawy, jednakże poza poprawnością merytoryczną należy zwracać uwagę także na stronę edytorską tekstu.

Uwagi krytyczne przedstawione w niniejszej recenzji mają charakter drugorzędny i nie wpływają na moją wysoką ocenę rozprawy.

Wniosek końcowy.

Rozprawę doktorską mgr inż. Doroty Kołbuk oceniam wysoko jako wnoszącą oryginalny wkład do wiedzy w zakresie kształtowania się struktury włókien w procesie elektroprzędzenia oraz zastosowań włóknin uzyskanych tą metodą w hodowlach komórkowych *in vitro* w inżynierii tkankowej. Systematycznie i dobrze dobrane badania doświadczalne pozwoliły na wiarygodne uzyskanie znaczących i oryginalnych wniosków w zakresie postawionego celu rozprawy. W moim przekonaniu rozprawa doktorska mgr inż. Doroty Kołbuk spełnia wymagania Ustawy o stopniach i tytułach naukowych. Wnioskuje o dopuszczenie mgr inż. Doroty Kołbuk do kolejnych etapów przewodu doktorskiego mającego na celu nadanie Jej stopnia naukowego doktora nauk technicznych w dyscyplinie Inżynieria Materiałowa.



Prof. dr hab. Leszek Jarecki

Warszawa, 4.01.2013 r.