

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

Recenzja rozprawy doktorskiej mg Klaudii Szafran
pt. „WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE WIELOSKŁADNIKOWYCH
FILMÓW WYBRANYCH SUBSTANCJI BIOAKTYWNYCH OSADZONYCH
NA NOŚNIKU PET W ASPEKCIE ZASTOSOWAŃ MEDYCZNYCH”

Promotor: dr hab. Małgorzata Jurak, profesor UMCS

Promotor pomocniczy: dr Robert Mrocza, KUL

1. Treść i zakres rozprawy doktorskiej

Praca przedstawiona do oceny poświęcona jest sprawdzeniu możliwości pokrywania nośników stałych jedno-, dwu- lub trójskładnikową monowarstwą z wykorzystaniem metody przeniesienia z fazy ciekłej. Celem takich działań jest pokrycie powierzchni np. stentów, związkami, które będą nie tylko naśladowały naturalne struktury komórkowe (np. fosfolipidy), lecz także będą mogły uwalniać do organizmu związki o charakterze terapeutycznym.

Implantologia, choć poczyniła w ostatnich latach znaczne postępy, to ciągle stoi przed szeregiem wyzwań. Jednym z tych wyzwań jest znalezienie takich pokryć dla implantów, które zapobiegłyby negatywnej odpowiedzi układu immunologicznego skutkującej tworzeniu stanu zapalnego i/lub odrzuceniu implantu. Implanty wykonuje się zazwyczaj z metalu lub tworzywa, np. poli(tereftalanu etylenu). Poli(tereftalan etylenu), PET, wykorzystywany jest do rekonstrukcji naczyń krwionośnych lub jako pokrycia dla np. metalowych stentów. Niestety PET nie jest biokompatybilny i często wywołuje negatywną odpowiedź immunologiczną. Z tego względu implanty wykonane z PET powinny być pokryte związkami gwarantującymi biogodność. Takim związkiem może być wybrany w badaniach Doktorantki chitozan. Chitozan to polisacharyd będący pochodną chityny. Bardzo liczne badania potwierdziły jego biokompatybilność oraz brak cytotoksyczności. Dodatkowo ma on dobre własności sorpcyjne, co może być wykorzystane do wiązania, a następnie powolnego uwalniania leków w organizmie. Przeszkodą do wykorzystania chitozanu jako pokrycia jest fakt, że staje się on polikationem w kontakcie z krwią, co sprzyja adhezji składników krwi i tworzeniu skrzepu. Jednak możliwe jest połączenie chitozanu z substancjami immunosupresyjnymi, przeciwutleniającymi i/lub przyjaznymi dla składników krwi

czy komórek i błon biologicznych. Te własności chitozanu nasunęły Doktorantce pomysł wykorzystania chitozanu, jako pokrycia dla PET wzbogaconego w cyklosporynę A (CsA, związek immunosupresyjny), galusan laurylu (LG, związek przeciwutleniający) i fosfolipidy (DOPC i DPPC). Pokrycia wykonywano metodą przeniesienia monowarstwy z fazy ciekłej.

Zakres pracy obejmował scharakteryzowanie własności fizykochemicznych ciekłych filmów jedno-, dwu- i trójskładnikowych zawierających CsA, LG lub/i DOPC utworzonych na fazie wodnej, fazie zawierającej roztwór kwasu octowego, fazie zawierającej roztwór kwasu octowego i chitozan. W następnej kolejności określono mechanizmy oddziaływań między cząsteczkami składającymi się na poszczególne układy. Określono także wpływ chropowatości powierzchni ciała stałego na monowarstwy przeniesione na fazę stałą. Pracę zakończono scharakteryzowaniem własności fizykochemicznych monowarstw przeniesionych na ciało stałe pod kątem struktury i oddziaływań międzycząsteczkowych.

Praca podzielona została na trzy części: część literaturową (5 rozdziałów), część eksperymentalną (6 rozdziałów) oraz część opisu i dyskusji wyników (4 rozdziały) uzupełnione spisem literatury i dorobkiem naukowym Doktorantki. W części literaturowej Doktorantka przedstawiła ogólne informacje o biomateriałach (Rozdział 1.), materiały stosowane do projektowania powierzchni biokompatybilnych (Rozdział 2.), metody wykorzystywane do preparatyki filmów i ich charakteryzacji na granicy powietrze/ciecz (Rozdział 3.), opis metody aktywacji powierzchni przy użyciu plazmy (Rozdział 4.) oraz metody wykorzystywane do charakteryzacji powierzchni stałych (Rozdział 5.). Część eksperymentalna poświęcona jest przedstawieniu substancji stosowanych w badaniach (Rozdział 6.), sposobu przygotowania roztworów (Rozdział 7.), sposobu otrzymywania monowarstw i ich charakteryzacji (Rozdział 8.), otrzymywaniu monowarstw Langmuira-Blodgett (LB, Rozdział 9.), sposobu przygotowania płytek PET (Rozdział 10.) oraz przedstawieniu sposobu badania właściwości fizykochemicznych monowarstwy LB (Rozdział 11.). Ostatnia część pracy zawiera badania przedstawiające otrzymywanie i charakteryzację monowarstw na powierzchni fazy ciekłej (Rozdział 12.), dobór warunków przenoszenia filmów z granicy faz ciecz/powietrze na nośnik stały (Rozdział 13.) oraz charakteryzację monowarstw przeniesionych na nośnik stały (Rozdział 14.). Wyniki badań zostały podsumowane w Rozdziale 15.

Praca ma dobrą konstrukcję i prowadzi czytelnika przez zagadnienia omawiane i badane w pracy. Na uwagę zasługuje przywołanie danych literaturowych przy omawianiu uzyskanych wyników badań.

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 Klaudii Szafran liczy 229 stron z licznymi rysunkami, tabelami, streszczeniem w j. polskim i angielskim, spisem literatury (292 pozycje) i dorobkiem naukowym Doktorantki.

2. Ocena merytoryczna rozprawy

Recenzowana rozprawa doktorska miała na celu zbadanie możliwości tworzenia monowarstwowych pokryć implantów metodą przeniesienia z fazy ciekłej. Doktorantka

rozpoczęła badania od scharakteryzowania monowarstw Langmuira jedno- (DOPC, CsA, LG), dwu- (DOPC-CsA) lub trójskładnikowych (DOPC-CsA-LG) tworzonych na granicy faz powietrze/ciecz. Jako subfazę wykorzystano wodę, roztwór kwasu octowego oraz roztwór chitozanu w roztworze kwasu octowego. Badania realizowane w subfazie wodnej miały na celu określenie optymalnych proporcji pomiędzy składnikami a także określenie wzajemnych oddziaływań pomiędzy składnikami monowarstwy. Ze względu na to, że roztwór kwasu octowego stanowi rozpuszczalnik dla chitozanu, Doktorantka scharakteryzowała także monowarstwy w środowisku kwasu octowego. Kończąc ten etap badań przeprowadzono charakteryzację monowarstw w środowisku zawierającym chitozan. Doktorantka stwierdziła, że wszystkie monowarstwy znajdują się w stanie ciekłym rozprężonym lub pośrednim LE-LC, obecność chitozanu wpływa na zmianę upakowania monowarstw, lecz nie wpływa na wzajemne oddziaływania składników monowarstwy a chitozan oddziałując ze składnikami monowarstwy zwiększa jej stabilność.

W kolejnym etapie eksperymentów określono optymalne warunki przenoszenia monowarstwy z fazy ciekłej na nośnik stały przy użyciu techniki Langmuira-Blodgett. Jako stały nośnik zastosowano PET aktywowany plazmą niskotemperaturową (PET_p), mikę, mikę pokrytą złotem oraz szkło pokryte złotem. Takie zróżnicowanie powierzchni pozwoliło na określenie wpływu właściwości powierzchni (a szczególnie jej chropowatości) na charakterystykę osadzanych na niej monowarstw. Doktorantka określiła optymalne warunki przenoszenia wykazując, że monowarstwa DOPC-CsA-LG 0,50 wykazuje największą stabilność w fazie ciekłej. Współczynnik przeniesienia dla wszystkich powierzchni był bliski jedności, co świadczy o ilościowym przeniesieniu monowarstw.

Ostatnia część pracy przedstawiała charakterystykę monowarstw jedno- i wieloskładnikowych przeniesionych na PET aktywowany plazmą niskotemperaturową, na mikę i na mikę pokrytą złotem. Doktorantka stwierdziła, że chropowatość pokrytej powierzchni silnie zależy od struktury cząsteczek tworzących monowarstwę, od jej składu oraz od rodzaju podłoża, na które monowarstwa jest przenoszona. Obecność chitozanu w przenoszanej warstwie w większości przypadków zwiększa chropowatość powierzchni, lecz wyznaczona wartość mieści się w optymalnym zakresie określonym dla materiałów hemokompatybilnych. Podobnie zwilżalność powierzchni PET_p pokrytej filmem chitozanowym i/lub monowarstwą jedno- lub wieloskładnikową mieści się w optymalnym zakresie zwilżalności powierzchni materiałów stosowanych w inżynierii tkankowej.

Podsumowując badania Doktorantki można stwierdzić, że opracowane pokrycia wieloskładnikowe otrzymane metodą przeniesienia z fazy ciekłej są odpowiednie do uzyskania powierzchni biokompatybilnej o szerokim spektrum zastosowań biomedycznych.

Stwierdzam, że mgr Klaudia Szafran 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 pokryć hemokompatybilnych. Niewątpliwą zaletą pracy jest wykorzystanie i stosowanie przez Doktorantkę szeregu nowoczesnych technik analitycznych (pomiar potencjału powierzchniowego, pomiar kąta Brewstera, AFM, TOF-SIMS, CA, QCM, CV), co pozwoliło na precyzyjną analizę zachodzących zjawisk. Wyniki badań Doktorantki zostały opublikowane w 9 publikacjach

zamieszczonych w czasopismach z tzw. „Listy filadelfijskiej” i 2 publikacji zamieszczonych w czasopiśmie spoza „listy” (indeks Hirsha 6, liczba cytowań 126 wg Scopus)

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

- zaprojektowanie i scharakteryzowanie nowoczesnych powłok dla implantów/stentów o szerokim potencjale aplikacyjnym w inżynierii tkankowej,
- scharakteryzowanie właściwości monowarstw jedno- i wieloskładnikowych badanych związków (DOPC, CsA, LG) otrzymanych na ciekłej fazie nośnej (woda, roztwór kwasu octowego, roztwór chitozanu w roztworze kwasu octowego),
- określenie organizacji cząsteczek podczas sprężania oraz określenie ich wzajemnych oddziaływań,
- określenie optymalnych warunków przenoszenia monowarstw na podłoże stałe (PET_p, mikę, mikę pokrytą złotem, szkło pokryte złotem),
- scharakteryzowanie monowarstw przeniesionych na fazę stałą z wykorzystaniem nowoczesnych technik analitycznych, które potwierdziły, że opracowane nowatorskie powłoki są odpowiednie do uzyskania powierzchni biokompatybilnej o szerokim spektrum zastosowań biomedycznych.

W trakcie czytania pracy nasuwają się jednak pewne pytania:

1. Monowarstwy jedno- i wieloskładnikowe przenoszono z fazy ciekłej na fazę stałą. Jaka jest stabilność otrzymanych powłok uzyskanych na PET_p przy ponownym umieszczeniu w środowisku wodnym np. w środowisku krwi; czy możliwa jest desorpcja powłok do fazy ciekłej?
2. W badaniach stosowano chitozan o masie cząsteczkowej 100-300 kDa i stopniu deacetylacji 82%. W jaki sposób masa cząsteczkowa i stopień deacetylacji będą wpływały na tworzenie monowarstw na granicy ciecz/powietrze?
3. Czy wykonano testy cytotoksyczności uzyskanych powłok?

Uwagi o charakterze edytorskim:

1. Przegląd danych literaturowych nie zawiera informacji dotyczących tworzenia monowarstw na granicy faz powietrze/ciecz i przenoszenia ich na ciało stałe (dane literaturowe przywoływano jedynie przy omawianiu wyników badań). Czy takie badania były już prowadzone dla podobnych lub innych związków?
2. Rozdział 11.3.: w opisie metody pomiaru zwilżalności nie podano jaką objętość miała kropla nanoszona na powierzchnię badaną za pomocą mikrostrzykawki
3. Zdjęcia obrazujące wyniki badań zamieszczone w pracy są zbyt małe i trudne do analizy,

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 poszerzają wiedzę

na temat tworzenia pokryć do zastosowań w inżynierii tkankowej. Opracowanie stanowi oryginalny dorobek autorki.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska p. mgr Klaudii Szafran spełnia wymagania formalne w odniesieniu do pracy doktorskiej, odpowiada wymogom ustawy o tytule i stopniach naukowych z dnia 20 lipca 2018 (Dz.Ustaw 2018 poz, 1668 wraz z późniejszymi zmianami). Zwracam się, zatem do Rady Instytutu Nauk Chemicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o przyjęcie pracy oraz dopuszczenie p. mgr Klaudii Szafran do dalszych etapów postępowania przewidzianego w przewodzie doktorskim. Jednocześnie wysoko oceniając przedstawioną do oceny pracę wnioskuję o jej wyróżnienie.


dr hab. inż. Małgorzata Jaworska