



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Chemii



UCZELNIA
BADAWCZA
INICJATYWA DOSKONAŁOŚCI

Katedra Chemii Biomateriałów i Kosmetyków

Nowe materiały biopolimerowe modyfikowane związkami fenolowymi do zastosowań medycznych

dr Beata Kaczmarek-Szczepańska

Dziedzina nauk ścisłych i przyrodniczych

Dyscyplina naukowa: nauki chemiczne

Załącznik nr 3

Toruń 2024

Spis treści

1. Dane osobowe.....	3
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych ..	4
4. Omówienie osiągnięcia, o którym mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy 2.0, stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego.....	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	4
4.2. Publikacje składające się na osiągnięcie naukowe	4
4.3. Cel naukowy badań.....	8
4.4. Przedstawienie najważniejszych wyników	13
4.5. Podsumowanie	41
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	43
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.....	48
7. Plany badawcze.....	50
8. Literatura	51
9. Parametry naukometryczne całego dorobku publikacyjnego	52

1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: Beata Kaczmarek-Szczepańska

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

2023 r. Dyplom ukończenia studiów podyplomowych

Wyższa Szkoła Bankowa w Warszawie

Studia podyplomowe „Agile i scrum. Zwinne zarządzanie projektami”

2019 r. Doktor nauk chemicznych

Tytuł pracy: Kompozyty kolagenu, chitozanu oraz kwasu hialuronowego jako matryce dla nanocząstek nieorganicznych

Promotor: prof. dr hab. Alina Sionkowska

Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

2019 r. Dyplom ukończenia studiów podyplomowych

Wyższa Szkoła Bankowa w Toruniu

Studia podyplomowe „Zarządzanie projektami”

2016 r. Dyplom ukończenia studiów podyplomowych

Wyższa Szkoła Zawodowa Kosmetyki i Pielęgnacji Zdrowia w Warszawie

Studia podyplomowe „Chemia i Technologia Kosmetyków”

2013 r. Magister z zakresu chemii

Tytuł pracy: Antibiotic release from chitosan and collagen composites

Promotor: prof. dr hab. Alina Sionkowska

Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Specjalność: Chemistry for Advanced Materials

2011 r. Licencjat z zakresu chemii

Tytuł pracy: Zastosowanie polimerów syntetycznych w kosmetyce włosów i paznokci

Promotor: dr hab. Katarzyna Lewandowska, prof. UMK

Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Specjalność: Chemia kosmetyczna

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Okres zatrudnienia	Stanowisko i miejsce zatrudnienia
--------------------	-----------------------------------

2019-obecnie	adiunkt Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Chemii
--------------	--

2018-2019	asystent Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Chemii
-----------	---

4. Omówienie osiągnięcia, o którym mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy 2.0, stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Nowe materiały biopolimerowe modyfikowane związkami fenolowymi do zastosowań medycznych

4.2. Publikacje składające się na osiągnięcie naukowe

Na osiągnięcie naukowe składa się 11 publikacji (H1-H11)

H1: **Kaczmarek Beata***, Miłek Oliwia, Nadolna Kinga, Owczarek Agata, Kleszczyński Konrad, Osyczka Anna Maria; Normal and cancer cells response on the thin films based on chitosan and tannic acid; Toxicology in Vitro 62 (2020) 104699

IF = 2,959 (bieżący 3,2); MNiSW = 100 (obecnie: 100); Q2

Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji wszystkich badań i sformułowanie hipotezy badawczej, zaprojektowaniu badań, przygotowaniu filmów na bazie chitozanu oraz kwasu taninowego, nadzorowaniu prowadzonych badań, dyskusji uzyskanych wyników, przygotowaniu pracy do druku oraz korespondencji z recenzentami pracy.

H2: **Kaczmarek-Szczepanska Beata***, Wekwejt Marcin, Mazur Olha, Zasada Lidia, Palubicka Anna, Olewnik-Kruszkowska Ewa; The physicochemical and antibacterial properties of chitosan-based materials modified with phenolic acids irradiated by UVC light; International Journal of Molecular Sciences 22 (2021) 1-16

IF = 6,208 (bieżący 5,6); MNiSW = 140 (obecnie 140); Q1

Mój wkład w powstanie pracy polegał na zdefiniowaniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu koncepcji badań, przygotowaniu filmów na bazie chitozanu z dodatkiem kwasów fenolowych, zaprojektowaniu badań, wykonania charakterystyki fizykochemicznej filmów, zaplanowaniu i nadzorowaniu poszczególnych etapów realizacji pracy, analizie wyników, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości oraz korespondencji z recenzentami pracy. Badania były finansowane w ramach projektu, którego byłam kierownikiem.

H3: **Kaczmarek Beata***, Wekwejt Marcin, Nadolna Kinga, Owczarek Agata, Mazur Olha, Pałubicka Anna; The mechanical properties and bactericidal degradation effectiveness of tannic acid-based thin films for wound care; Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials 110 (2020) 103916

IF = 3,372 (bieżący 3,9); MNiSW = 100 (obecnie 100); Q2

Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji oraz zaplanowaniu wszystkich badań, sformułowaniu hipotezy, wyborze metod badawczych niezbędnych do przeprowadzenia doświadczenia, przygotowania filmów na bazie kwasu taninowego, nadzorowaniu prowadzonych badań, dyskusji uzyskanych wyników oraz na przygotowaniu pracy do druku, jak i korespondowaniu z recenzentami pracy.

H4: **Kaczmarek-Szczepańska Beata***, Sosik Adrianna, Małkowska Anna, Zasada Lidia, Michalska-Sionkowska Marta; Chitosan-based films enriched by caffeic acid with poly(ethylene glycol): a physicochemical and antibacterial properties evaluation; International Journal of Biological Macromolecules 192 (2021) 728-735

IF = 6,953 (bieżący 8,2); MNiSW = 100 (obecnie 100); Q1

Mój wkład w powstanie pracy polegał na zdefiniowaniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu przebiegu badań, przygotowaniu filmów na bazie chitozanu oraz kwasu kawowego, opracowaniu metodyki, interpretacji

wyników, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości oraz dyskusji z edytorem czasopisma i recenzentami. Badania były finansowane w ramach projektu, którego byłam kierownikiem.

- H5: **Kaczmarek-Szczepańska Beata**, Michalska-Sionkowska Marta, Mazur Olha, Świąteczak Joanna, Swiontek Brzezinska Maria*; The role of microorganisms in biodegradation of chitosan/tannic acid materials; International Journal of Biological Macromolecules 184 (2021) 584-592

IF = 6,953 (bieżący 8,2); MNiSW = 100 (obecnie: 100); Q1

Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, sformułowaniu hipotezy badawczej, przygotowaniu filmów na bazie chitozanu oraz kwasu taninowego, wykonaniu charakterystyki filmów przed i po degradacji. Mój wkład w powstanie tej pracy obejmuje również interpretację i opis uzyskanych wyników dotyczących charakterystyki materiałów, współpracowanie oraz współredagowanie manuskryptu wraz z dr hab. Marią Swiontek Brzezinską, prof. UMK.

- H6: Wekwejt Marcin, Małek Marcin, Ronowska Anna, Michno Anna, Pałubicka Anna, Zasada Lidia, Klimek Agnieszka, **Kaczmarek-Szczepańska Beata***; Hyaluronic acid/tannic acid films for wound healing application; International Journal of Biological Macromolecules 254 (2024) 128101

IF = 8,2 (bieżący 8,2); MNiSW = 100 (obecnie: 100); Q1

Mój wkład w powstanie pracy polegał na zdefiniowaniu podjętego problemu naukowego, opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i nadzorowaniu poszczególnych etapów realizacji pracy, wykonaniu badań związanych z charakterystyką fizykochemiczną filmów, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości oraz korespondencji z recenzentami pracy. Badania były finansowane w ramach projektu, którego byłam kierownikiem.

- H7: **Kaczmarek-Szczepańska Beata***, Polkowska Izabela, Paździor-Czapula Katarzyna, Nowicka Beata, Gierszewska Magdalena, Michalska-Sionkowska Marta, Otrocka-Domagala Iwona; Chitosan/phenolic compounds scaffolds for connective tissue regeneration; Journal of Functional Biomaterials 14 (2023) 69

IF = 4,8 (bieżący: 4,8); MNiSW = 100 (obecnie: 100); Q2

Mój wkład w powstanie pracy polegał na zdefiniowaniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu badań i nadzorowaniu poszczególnych etapów realizacji pracy, wykonaniu badań związanych z charakterystyką fizykochemiczną skafoldów, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości oraz korespondencji z recenzentami pracy. Badania były finansowane w ramach projektu, którego byłam kierownikiem.

- H8: **Kaczmarek-Szczepanska Beata***, Mazur Olha, Michalska-Sionkowska Marta, Lukowicz Krzysztof, Osyczka Anna Maria: The preparation and characterization of chitosan-based hydrogels cross-linked by glyoxal, *Materials* 14 (2021) 1-12

IF = 3,748 (bieżący: 3,4); MNiSW = 140 (obecnie 140); Q2

Mój wkład w powstanie pracy polegał na zdefiniowaniu podjętego problemu naukowego, opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu badań i nadzorowaniu poszczególnych etapów realizacji pracy, wykonaniu badań związanych z charakterystyką fizykochemiczną materiałów, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości oraz korespondencji z recenzentami pracy. Badania były prowadzone w ramach projektu, którego byłam kierownikiem.

- H9: **Kaczmarek Beata***, Nadolna Kinga, Owczarek Agata, Mazur Olha, Sionkowska Alina, Lukowicz Krzysztof, Vishnu Jithin, Manivasagam Geetha, Osyczka Anna Maria; Properties of scaffolds based on chitosan and collagen with bioglass 45S5; *IET Nanobiotechnology* 14 (2020) 830-832

IF = 1,847 (bieżący: 2,3); MNiSW = 70 (obecnie: 70); Q3

Mój wkład w powstanie pracy polegał na zdefiniowaniu hipotezy badawczej, przygotowaniu skafoldów z dodatkiem bioszkła, opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i nadzorowaniu badań, analizie wyników, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości oraz korespondencji z recenzentami pracy. Badania były objęte projektem, którego byłam kierownikiem.

- H10: **Kaczmarek-Szczepanska Beata***, Polkowska Izabela, Malek Marcin, Kluczynski Janusz, Pazdzior-Czapula Katarzyna, Wekwejt Marcin, Michno Anna, Ronowska Anna, Pałubicka Anna, Nowicka Beata, Otrocka-Domagała Iwona; The

characterization of collagen-based scaffolds modified with phenolic acids for tissue engineering application; Scientific Reports 13 (2023) 1-12

IF = 4,6 (bieżący: 4,6); MNiSW = 140 (obecnie: 140); Q1

Mój wkład w powstanie pracy polegał na zdefiniowaniu podjętego problemu naukowego, opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu badań i nadzorowaniu poszczególnych etapów realizacji pracy, wykonaniu badań związanych z charakterystyką fizykochemiczną skafoldów, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości oraz korespondencji z recenzentami pracy. Badania były współfinansowane w ramach projektu, którego byłam kierownikiem.

H11: **Kaczmarek-Szczepańska Beata***, Miłek Oliwia, Michalska-Sionkowska Marta, Osyczka Anna Maria; Bio-studies of scaffolds based on chitosan/tannic acid cross-linked by glyoxal; Materials Letters 292 (2021) 129667

IF = 3,204 (bieżący 3,0); MNiSW = 70 (obecnie: 70); Q2

Mój wkład w powstanie pracy polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej oraz opracowaniu koncepcji badań i określeniu ich celu, nadzorowaniu prowadzonych badań, przygotowaniu skafoldów na bazie chitozanu oraz kwasu taninowego z dodatkiem glioksalu jako środka sieciującego, dyskusji uzyskanych wyników, przygotowaniu pracy do druku oraz korespondencji z recenzentami pracy.

Podsumowanie

	Zgodnie z rokiem publikacji	Bieżący
IF sumaryczny	51,597	55,400
Liczba punktów MNiSW	1160	1160**

* autor korepondencyjny

** zgodnie z wykazem MNiSW z dnia 5 stycznia 2024 r.

4.3. Cel naukowy badań

Wprowadzenie

Biopolimery, zarówno polisacharydy, jak i białka, znalazły szerokie zastosowanie w różnych dziedzinach życia, cechując się szeregiem zalet w porównaniu z polimerami

syntetycznymi, a istotną korzyścią wynikającą z ich naturalnego pochodzenia jest ich nieszkodliwość dla środowiska [1,2]. Obserwowany wzrost zainteresowania biomakrocząsteczkami jako surowcami do otrzymywania biomateriałów uwarunkowany jest ich biokompatybilnością, dzięki czemu można je stosować w medycynie (m.in. w opatrunkach, suplementach diety, rusztowaniach w inżynierii tkankowej) [1–3].

Wyzwanie związane z wykorzystaniem naturalnych polimerów do opracowania nowych materiałów do zastosowań medycznych dotyczy zrozumienia ich właściwości fizykochemicznych oraz biologicznego sposobu ich działania. Materiały na bazie biopolimerów charakteryzują się słabymi właściwościami mechanicznymi oraz słabą stabilnością. Co więcej, naturalne polimery sprzyjają namnażaniu się patogenów, co z kolei stwarza ryzyko infekcji w przypadku ich wykorzystania w kontakcie z organizmem ludzkim [4]. Dlatego konieczne jest podejmowanie działań mających na celu poprawę właściwości materiałów otrzymanych z biopolimerów prowadzących do polepszenia ich właściwości fizykochemicznych, takich jak chropowatość i wartość swobodnej energii powierzchniowej, oraz także właściwości mechanicznych, przyczyniających się do ich ochrony przed działaniem drobnoustrojów.

W celu poprawy właściwości materiałów biopolimerowych przeprowadza się procesy sieciowania polimerów. Metody sieciowania mogą być klasyfikowane w dwojaki sposób – w zależności od czynnika sieciującego lub w zależności od zachodzącego mechanizmu sieciowania, można więc wyróżnić sieciowanie chemiczne oraz fizyczne. Sieciowanie chemiczne według podziału metod na podstawie rodzaju czynnika sieciującego obejmuje wprowadzenie do materiału substancji, które mają zdolność do reagowania lub oddziaływania z grupami funkcyjnymi obecnymi w łańcuchu polimerowym, w wyniku czego mogą tworzyć się wiązania kowalencyjne lub oddziaływania między środkiem sieciującym a polimerem. Substancje te mogą być pochodzenia naturalnego lub syntetycznego. Sieciowanie chemiczne można przeprowadzić poprzez wprowadzenie środka sieciującego do roztworu polimerowego lub zanurzenie gotowego materiału polimerowego w roztworze środka sieciującego [5,6]. Drugi rodzaj sieciowania, sieciowanie czynnikami fizycznymi, może następować w wyniku ekspozycji materiału na czynniki fizyczne takie jak podwyższona temperatura, promieniowanie UV czy promieniowanie gamma [7]. Ważne jest jednak, aby sieciowanie czynnikami fizycznymi było prowadzone w sposób kontrolowany, ponieważ istnieje ryzyko degradacji materiału w przypadku nadmiernej ekspozycji na fizyczne czynniki sieciujące.

Analizując stan dotychczasowych badań pod kątem doboru czynników sieciujących materiały biopolimerowe można stwierdzić, iż rośnie zainteresowanie wykorzystania tych

sposobów sieciowania, które nie są szkodliwe dla organizmu ludzkiego, a jednocześnie przyczyniają się do poprawy właściwości otrzymywanych materiałów. Z uwagi na obecne trendy w projektowaniu i otrzymywaniu materiałów na bazie polimerów naturalnych **w swoich badaniach skupiłam się na poszukiwaniu naturalnych środków sieciujących, których zastosowanie przyczyni się do poprawy właściwości fizykochemicznych materiałów biopolimerowych względem materiałów niesieciowanych przy jednoczesnym nadaniu im lub poprawieniu ich właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Projektowałam i wytwarzałam nowe materiały, przykładając szczególną uwagę do zrozumienia wpływu związków fenolowych na biopolimery na poziomie molekularnym.**

Poszukując potencjalnych środków sieciujących, które można wykorzystać do otrzymania biomateriałów na bazie polimerów naturalnych, dostrzegłam możliwość wykorzystania do tego celu związków fenolowych. Związki fenolowe zawierają bowiem w swojej strukturze liczne grupy hydroksylowe, zdolne do oddziaływania z hydrofilowymi grupami funkcyjnymi łańcuchów polimerowych, takich jak grupy aminowe oraz hydroksylowe. Związki te występują głównie w owocach i warzywach, i są produktami ubocznymi metabolizmu roślin. Charakteryzują się zróżnicowaną budową, masą cząsteczkową, właściwościami biologicznymi, chemicznymi i fizycznymi. Prowadzone przeze mnie badania dotyczyły weryfikacji możliwości ich wykorzystania do otrzymania materiałów biopolimerowych dedykowanych do zastosowań medycznych.

Cel badań prowadzonych w ramach habilitacji

Celem moich badań, które stanowią podstawę do ubiegania się o stopień habilitacyjny, było zweryfikowanie potencjału związków fenolowych jako środków sieciujących biopolimery, a także eksploracja ich potencjalnych właściwości bioaktywnych. Jednocześnie dążyłam do zrozumienia mechanizmu działania związków fenolowych na biopolimery z perspektywy chemicznej oraz powiązania tego mechanizmu z uzyskanymi właściwościami materiałów biopolimerowych. W tym kontekście wykorzystałam biopolimery, w szczególności chitozan, kolagen oraz kwas hialuronowy. Wybór tych substancji był podyktowany ich biokompatybilnością, zdolnością do stymulowania procesów regeneracji tkanek i promowania gojenia się ran, oraz szerokim dostępem na rynku. Natomiast do modyfikacji biopolimerów wyselekcjonowałam związki fenolowe, które według mnie mają zdolność do pełnienia podwójnej roli. Z jednej strony, mogą działać jako środki sieciujące biopolimery, poprawiając właściwości fizykochemiczne uzyskanych materiałów, z drugiej zaś, działają

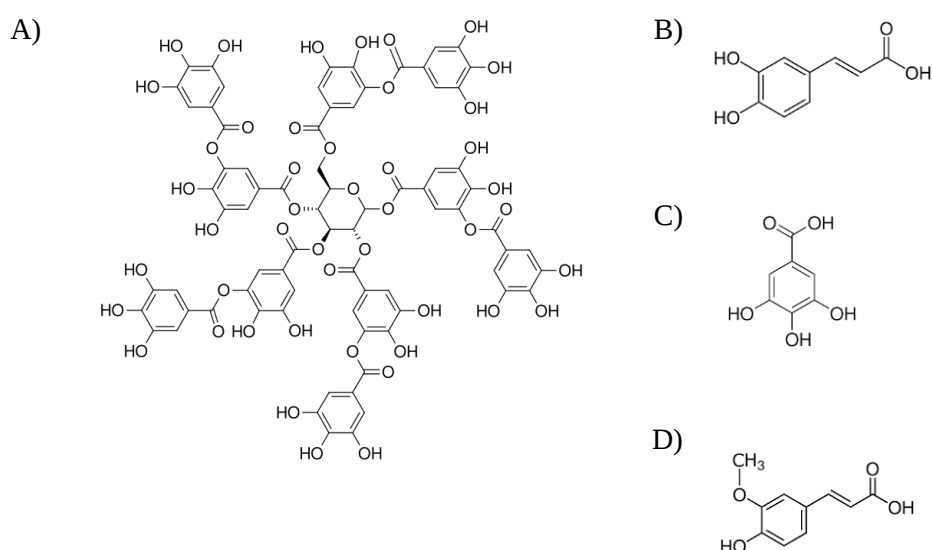
przeciwbakteryjnie, przeciwzapalnie, przeciwnowotworowo, oraz antyoksydacyjnie [8]. Związki te były dotychczas znane w literaturze jako substancje wykazujące aktywność biologiczną. Jednak jako pierwsza wykorzystałam zdolność związków fenolowych do sieciowania biopolimerów do otrzymywania materiałów o szerokim zastosowaniu w medycynie. Dodatkowo, jako pierwsza dokonałam wszechstronnej charakterystyki uzyskanych materiałów, zarówno fizykochemicznej, jak i biologicznej, w tym także porównałam ich biokompatybilność.

Aby zrealizować główny cel postawiony w kontekście osiągnięcia stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego, sformułowałam cele szczegółowe, takie jak:

- opracowanie metody wprowadzenia wybranych związków fenolowych do roztworu biopolimerów oraz sposobu zsyntetyzowania jednorodnych materiałów w formie filmów oraz skafoldów;
- scharakteryzowanie uzyskanych materiałów prowadzące do określenia ich właściwości fizykochemicznych, obejmujących właściwości powierzchniowe, takie jak chropowatość i wartość swobodnej energii powierzchniowej, oraz właściwości mechaniczne, a także zrozumienie mechanizmów sieciowania biopolimerów związkami fenolowymi na badane właściwości fizykochemiczne;
- zaprojektowanie materiałów biopolimerowych zawierających związki fenolowe podwójnie usieciowanych, poprzez dobór różnych dodatkowych czynników sieciujących (takich jak glioksal, glikol polietylenowy, bioszkło 45S5);
- określenie możliwości sterylizacji uzyskanych materiałów za pomocą promieniowania UVC;
- ocena właściwości biologicznych uzyskanych materiałów, takich jak aktywność przeciwbakteryjna, kompatybilność z krwią oraz komórkami, z wykorzystaniem metod *in vitro* wraz ze zrozumieniem wpływu oddziaływań oraz rodzaju komponentów materiału na poziomie molekularnym na ich właściwości biologiczne;
- ocena wpływu uzyskanych materiałów na środowisko, w tym ich zdolność do biodegradacji;
- ocena biokompatybilności materiałów z tkankami metodą *in vivo* poprzez ich implantacje w organizm zwierzęcy.

W pierwszym etapie badań moje zainteresowanie wzbudził kwas taninowy, który dotychczas znany był w literaturze jako związek wykazujący działanie przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe oraz hamujący krwawienie [9,10]. Kwas taninowy zbudowany jest bowiem z glukozy i 10 cząsteczek kwasu galusowego połączonych wiązaniem estrowym. Ze względu na obecność wielu grup hydroksylowych w resztach kwasu taninowego zauważyłam

możliwość jego wykorzystania jako środka sieciującego biopolimery. Ważną zaletę kwasu taninowego stanowi możliwość rozpuszczenia go w tych samych rozpuszczalnikach co badane przeze mnie biopolimery, czyli w wodzie oraz kwasie octowym. W swoich badaniach wykorzystałam również inne związki fenolowe, takie jak kwas galusowy, kwas kawowy oraz kwas ferulowy, które już wcześniej były znane w literaturze ze swojej aktywności biologicznej. Kwas galusowy (kwas 3,4,5-trihydroksybenzoesowy) wzbudził moje zainteresowanie jako związek sieciujący biopolimery ze względu na obecność aż czterech grup hydroksylowych w swojej strukturze. Z kolei kwas kawowy (kwas 3,4-dihydroksycynamonowy) jest pochodną kwasu cynamonowego, wzbogaconą o grupy fenolowe. Kwas ferulowy (kwas 4-hydroksy-3-metoksycynamonowy) jest także pochodną kwasu cynamonowego, jednak w porównaniu z kwasem kawowym, kwas ferulowy posiada jedną grupę metoksyową. Podsumowując, selekcji związków fenolowych dokonałam, biorąc pod uwagę ich budowę (obecność grup hydrofilowych), ich aktywność przeciwbakteryjną oraz przeciwutleniającą. Wzory strukturalne wykorzystanych związków fenolowych przedstawia rysunek 1.



Rysunek 1. Wzór kwasu taninowego (A), kwasu kawowego (B), kwasu galusowego (C), oraz kwasu ferulowego (D)

Mając na uwadze, iż opracowane przeze mnie materiały biopolimerowe mogą znaleźć zastosowanie w medycynie jako materiały opatrunkowe oraz powłoki implantów metalicznych, otrzymałam materiały modyfikowane związkami fenolowymi w formie cienkich filmów metodą odparowania rozpuszczalnika. Z kolei materiały dedykowane do zastosowania jako

rusztowania w inżynierii tkankowej wytworzyłam w formie porowatych struktur trójwymiarowych, tzw. skafoldów, wykorzystując do tego celu proces liofilizacji.

4.4. Przedstawienie najważniejszych wyników

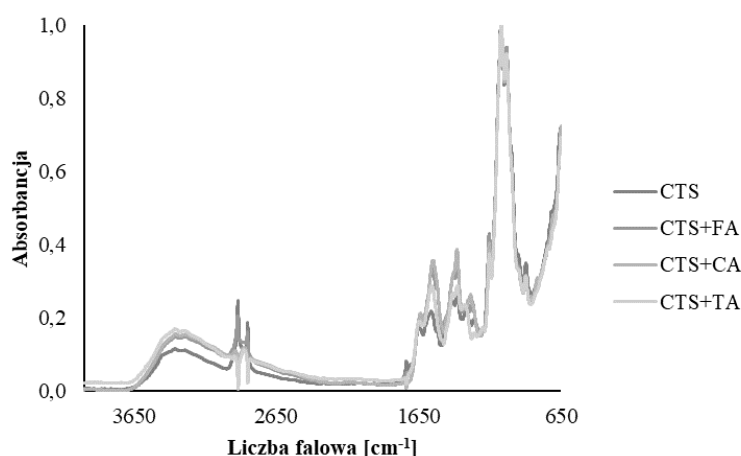
Założony przeze mnie cel badań prowadzonych w ramach osiągnięcia stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego zrealizowałam otrzymując materiały na bazie chitozanu, kolagenu i/lub kwasu hialuronowego, wzbogacone dodatkiem wyselekcjonowanych związków fenolowych. Proponowane przeze mnie związki fenolowe mają zdolność do tworzenia wiązań wodorowych z hydrofilowymi grupami funkcyjnymi wspomnianych biopolimerów, przez co dostrzegłam możliwość ich wykorzystania jako środki sieciujące. Materiały otrzymane przeze mnie w ramach osiągnięcia miały formę cienkich filmów [H1-H6] oraz skafoldów [H7-H11]. Zakres prowadzonych przeze mnie badań dotyczył oceny właściwości fizykochemicznych otrzymanych materiałów [H1-H4,H6-H9] oraz właściwości biologicznych, której dokonałam nawiązując współpracę z innymi ośrodkami naukowymi, krajowymi (Uniwersytet Jagielloński, Politechnika Gdańska, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wojskowa Akademia Techniczna, Gdański Uniwersytet Medyczny, Specjalistyczny Szpital w Kościerzynie) oraz zagranicznymi (University of Münster, Niemcy; Vellore Institute of Technology, Indie). Koordynowałam badania prowadzące do weryfikacji cytokompatybilności materiałów [H1,H6,H8-H11], badania biokompatybilności uzyskanych materiałów z krwią [H7,H10,H11], badania ich właściwości przeciwbakteryjnych [H2-H4,H6,H10], oraz badania na modelu zwierzęcym metodami *in vivo* [H7,H10]. Dodatkowo, mając na uwadze aspekt środowiskowy prowadzonych przeze mnie badań, nawiązałam współpracę z Wydziałem Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych UMK celem weryfikacji zdolności do biodegradacji otrzymanych przeze mnie materiałów [H5].

Właściwości fizykochemiczne materiałów w formie cienkich filmów

Materiały w formie cienkich filmów otrzymałam poprzez odparowanie rozpuszczalnika w warunkach pokojowych. Z uwagi na powolne tworzenie się wiązań wodorowych, które miały miejsce podczas tego procesu, możliwe było uzyskanie materiałów, w których związki fenolowe mogłyby uwalniać się *in situ*, co z kolei warunkuje ich aktywność. Następnie wyselekcjonowałam filmy, które otrzymane z wykorzystaniem tej metody były jednorodne w całej swojej objętości i poddałam je analizom fizykochemicznym.

Spektroskopia w podczerwieni została przeze mnie wykorzystana do zbadania oddziaływań

związków fenolowych z chitozanem. Analizując uzyskane widma, zaobserwowałam, że po wprowadzeniu związków fenolowych, takich jak kwas taninowy, kwas kawowy oraz kwas ferulowy, nie dochodzi do powstania nowych wiązań chemicznych (wykres 1). Proces sieciowania ma charakter fizyczny, polegający na tworzeniu się wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi obecnymi w strukturze związków fenolowych a grupami hydrofilowymi, takimi jak grupy aminowe oraz hydroksylowe, znajdującymi się w strukturze chitozanu.

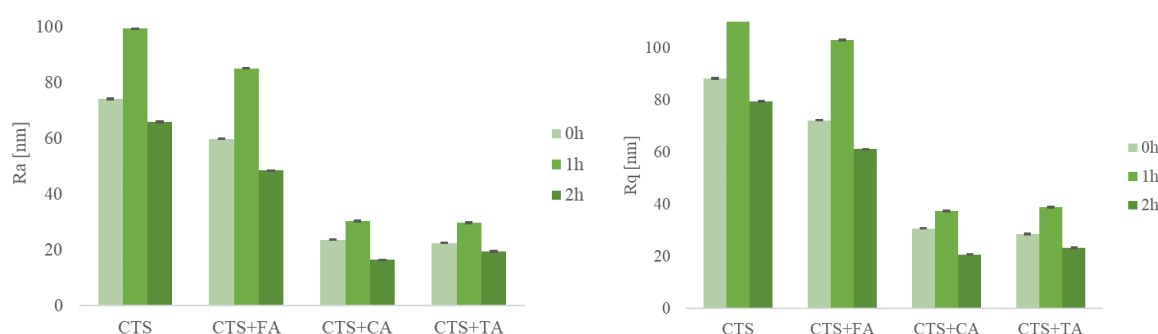


Wykres 1. Widmo FTIR-ATR dla filmów chitozanowych modyfikowanych kwasem ferulowym (FA), kwasem kawowym (CA) oraz kwasem taninowym (TA) [H2]

Dla biomateriałów, które mają kontakt z tkankami lub płynami biologicznymi, istotne jest posiadanie hydrofilowej powierzchni o niskiej swobodnej energii powierzchniowej, odnoszącej się do właściwości chemicznych powierzchni, ponieważ zachodzi pewnego rodzaju konkurencja między komórkami prawidłowymi a komórkami bakteryjnymi, które rywalizują o miejsce przy powierzchni materiału [11]. Materiał o chropowatej hydrofilowej powierzchni charakteryzującej się niską swobodną energią powierzchniową sprzyja natomiast adsorpcji białek oraz adhezji komórek. Występuje zatem W swoich badaniach określiłam także parametry mechaniczne otrzymanych filmów, ponieważ niska wytrzymałość mechaniczna filmów biopolimerowych jest jedną z ich głównych wad. W związku z tym moim celem było uzyskanie materiałów biopolimerowych modyfikowanych związkami fenolowymi charakteryzujących się mniejszą wartością chropowatości, niższą wartością swobodnej energii powierzchniowej oraz lepszymi właściwościami mechanicznymi niż materiały niemodyfikowane. Ważna dla mnie była korelacja natury chemicznej komponentów materiałów i ich wpływ na właściwości powierzchniowe w kontekście ich zastosowań w medycynie.

Właściwości powierzchniowe filmów

W ramach prowadzonych przeze mnie badań otrzymałam filmy chitozanowe (CTS) modyfikowane kwasem taninowym (TA) w stosunku wagowym 80/20, 50/50, 20/80 [H1]. Uzyskane wyniki wskazują na zmniejszenie obu parametrów chropowatości uzyskanych filmów wraz ze wzrostem ilości kwasu taninowego, jednak dla wszystkich materiałów wartości mieściły się w skali nanometrycznej. Zmiany chropowatości powierzchni filmów wynikają z oddziaływań pojawiających się między grupami funkcyjnymi obecnymi w strukturze chitozanu oraz kwasu taninowego, co powoduje zmianę ułożenia łańcucha polimerowego i zmniejszenie ilości grup rozmieszczonych na powierzchni materiału.



Wykres 2. Parametry chropowatości uzyskane dla powierzchni badanych filmów chitozanowych modyfikowanych kwasem ferulowym (FA), kwasem kawowym (CA) oraz kwasem taninowym (TA) przed (0h) oraz po 1 (1h) i 2 godzinach (2h) naświetlania [H2]

Materiały chitozanowe zmodyfikowałam także poprzez dodatek kwasu ferulowego (FA), kwasu kawowego (CA) oraz kwasu taninowego (TA) w ilości 10% wag. Każda taka modyfikacja wpłynęła na spadek chropowatości w stosunku do materiału niemodyfikowanego, ze względu na utworzenie oddziaływań z grupami hydrofilowymi obecnymi w strukturze chitozanu, co z kolei zmniejszyło ich ilość na powierzchni, a tym samym chropowatość otrzymanych materiałów (wykres 2). Filmy poddałam działaniu promieniowania UVC o długości fali 254 nm celem weryfikacji wpływu promieniowania na właściwości materiałów [H2]. Naświetlanie przez 1 godzinę spowodowało zwiększenie chropowatości powierzchni każdego rodzaju próbki ze względu na fotosieciowanie. Jednakże 2-godzinne napromienianie przyniosło odwrotny efekt, tj. zmniejszenie chropowatości w porównaniu do próbek nienapromieniowanych. Można to wytłumaczyć niszczącym działaniem promieniowania UV, w wyniku którego najmniej uporządkowane fragmenty próbek ulegają fotodegradacji do lotnych produktów.

Tabela 1. Parametry chropowatości uzyskane dla powierzchni filmów otrzymanych z mieszaniny kwasu hialuronowego oraz kwasu taninowego w stosunku 80/20, 50/50, 20/80 [H6]

Próbka	Ra [nm]	Rq [nm]
80HA/20TA	3,45 ± 0,17	4,21 ± 0,17
50HA/50TA	2,97 ± 0,13	3,88 ± 0,21
20HA/80TA	2,92 ± 0,10	3,84 ± 0,09

Określiłam także chropowatość filmów otrzymanych z mieszaniny kwasu hialuronowego oraz kwasu taninowego w stosunku 80/20, 50/50/, 20/80 (tabela 1) [H6]. Zwiększenie ilości kwasu taninowego powoduje zmniejszenie obu parametrów chropowatości, które zachodzą w wyniku zmiany w organizacji łańcucha polimerowego kwasu hialuronowego. Tym samym na powierzchni filmu występuje mniej grup funkcyjnych, a w efekcie zmniejsza się jej chropowatość.

Analizując uzyskane wyniki można stwierdzić, że dodatek kwasów fenolowych (kwasu taninowego, kwasu ferulowego oraz kwasu kawowego) do materiałów chitozanowych wpłynął na obniżenie chropowatości powierzchni materiałów, ze względu na różną budowę wykorzystanych związków fenolowych, występują różnice w ilości oraz sile oddziaływań tworzących się między chitozanem a związkiem fenolowym. Z kolei w badaniach wykonanych dla materiałów otrzymanych z mieszaniny kwasu hialuronowego oraz kwasu taninowego zaobserwowałam obniżenie chropowatości wraz ze wzrostem zawartości kwasu taninowego, podobnie jak w przypadku chitozanu, co oznacza, że obserwowana tendencja nie zależy od rodzaju biopolimeru. Obniżenie chropowatości powierzchni materiałów w formie cienkich filmów jest korzystne i może przyczynić się do poprawy integracji materiału z otaczającym środowiskiem. Zestawiając uzyskane wyniki, mogę stwierdzić, iż najkorzystniejsze parametry chropowatości wykazuje film chitozanowy zawierający kwas taninowy w stosunku 20/80.

Kolejnymi istotnymi parametrem charakteryzującym powierzchnię biomateriałów jest wartość swobodnej energii powierzchniowej, składowej polarnej oraz dyspersyjnej, ponieważ parametry te wpływają na oddziaływania komórka-materiał [12]. Wyzaczyłam kąt zwilżania powierzchni filmów z wykorzystaniem cieczy polarnej oraz niepolarniej, a następnie obliczyłam wartości wspomnianych parametrów metodą Owensa-Wendta. Na podstawie uzyskanych wyników zauważyłam, że wraz ze wzrostem ilości kwasu taninowego w materiale rośnie swobodna energia powierzchniowa oraz składowa polarna (tabela 2) [H3]. Dzieje się tak, ze względu na charakter hydrofilowy kwasu taninowego [13].

Analizując wartości uzyskane dla filmów otrzymanych z mieszaniny kwasu

hialuronowego oraz kwasu taninowego, zauważyłam, że wartość składowej polarnej zmniejszała się wraz ze wzrostem zawartości kwasu taninowego. Wynika to z faktu, że kwas hialuronowy jest wysoce hydrofilowy ($\log P$ -6,623) [H6]. Otrzymane zależności wartości swobodnej energii powierzchniowej, składowej polarnej oraz dyspersyjnej zależą zatem od polimeru, który został wykorzystany w mieszaninie z kwasem taninowym do otrzymania filmów.

Tabela 2. Składowa polarna ($\gamma_s P$), dyspersyjna ($\gamma_s D$) oraz swobodna energia powierzchniowa (γ_s) filmów na bazie chitozanu i kwasu taninowego w stosunku 80/20 i 50/50, obliczone na podstawie pomiaru kąta zwilżania dla wody oraz diiodometanu [H3] oraz filmów otrzymanych z mieszaniny kwasu hialuronowego oraz kwasu taninowego w stosunku 80/20, 50/50, 20/80 [H6]

Próbka	$\gamma_s P$ [mJ/m ²]	$\gamma_s D$ [mJ/m ²]	γ_s [mJ/m ²]
CTS	0,91 ± 0,02	28,27 ± 0,14	29,19 ± 0,16
80CTS/20TA	5,23 ± 0,18	29,79 ± 0,56	35,03 ± 0,74
50CTS/50TA	9,51 ± 0,26	28,10 ± 0,55	37,61 ± 0,80
80HA/20TA	30,22 ± 0,50	24,03 ± 0,48	54,25 ± 0,99
50HA/50TA	16,02 ± 0,24	28,15 ± 0,31	44,17 ± 0,56
20HA/80TA	15,41 ± 0,41	27,21 ± 0,81	42,61 ± 1,21

Obliczyłam także wartość swobodnej energii powierzchniowej dla filmów chitozanowych z dodatkiem wybranych związków fenolowych przed i po ekspozycji na promieniowanie UVC (tabela 3) [H2]. Dodatek związków fenolowych do chitozanu powoduje wzrost wartości składowej polarnej, co sugeruje, że wzrasta hydrofilowość filmu, w związku z obecnością wielu grup hydroksylowych w ich strukturze. Uzyskane wyniki wskazują, że napromieniowanie powierzchni materiałów trwające 1 i 2 godziny nie powoduje znaczących zmian wartości swobodnej energii powierzchniowej, składowej dyspersyjnej i polarnej.

Tabela 3. Swobodna energia powierzchniowa (γ_s) składowa dyspersyjna (γ_{sD}) i polarna (γ_{sP}) filmów chitozanowych z dodatkiem związków fenolowych przed i po ekspozycji na promieniowanie UVC, obliczone na podstawie pomiaru kąta zwilżania dla gliceryny oraz diiodometanu [H2]

Próbka	γ_{sP} [mJ/m ²]	γ_{sD} [mJ/m ²]	γ_s [mJ/m ²]
nienaświetlony			
CTS	1,36 ± 0,15	27,02 ± 0,30	28,39 ± 0,44
CTS+FA	3,29 ± 0,17	24,40 ± 0,15	27,68 ± 0,32
CTS+CA	3,76 ± 0,04	25,95 ± 0,12	26,71 ± 0,16
CTS+TA	3,44 ± 0,07	27,15 ± 0,17	30,58 ± 0,24
naświetlanie przez 1 godz.			
CTS	3,64 ± 0,14	28,13 ± 0,48	31,78 ± 0,62
CTS+FA	4,32 ± 0,13	28,76 ± 0,18	33,08 ± 0,31
CTS+CA	2,19 ± 0,16	24,07 ± 0,19	26,26 ± 0,35
CTS+TA	4,44 ± 0,10	27,38 ± 0,27	31,82 ± 0,37
naświetlanie przez 2 godz.			
CTS	7,36 ± 0,05	26,80 ± 0,12	34,16 ± 0,17
CTS+FA	7,46 ± 0,17	28,64 ± 0,41	36,10 ± 0,57
CTS+CA	1,94 ± 0,04	25,98 ± 0,08	27,92 ± 0,12
CTS+TA	3,39 ± 0,09	27,99 ± 0,14	31,39 ± 0,23

Podsumowując, na podstawie uzyskanych wyników można zauważyć, że wzrost hydrofilowości materiałów idzie w parze z wzrostem swobodnej energii powierzchniowej. Dodatek kwasu taninowego do materiałów chitozanowych przyczynia się do znacznego wzrostu hydrofilowości tych materiałów, co skutkuje jednoczesnym wzrostem swobodnej energii powierzchniowej. Natomiast im większa zawartość kwasu taninowego w filmie w porównaniu z kwasem hialuronowym, tym niższa hydrofilowość i energia powierzchniowa, ponieważ kwas hialuronowy wykazuje silniejszy charakter hydrofilowy niż kwas taninowy. Porównując parametry powierzchniowe filmów chitozanowych z dodatkiem kwasu ferulowego oraz kwasu kawowego, stwierdzam, że obecność tych związków fenolowych w materiale prowadzi do obniżenia energii swobodnej przy jednoczesnym wzroście hydrofilowości. Ta zależność dotyczy materiałów nienaświetlanych promieniowaniem UVC. Jednakże wykorzystanie promieniowania jako metody sterylizacji materiałów powoduje zmiany w ich

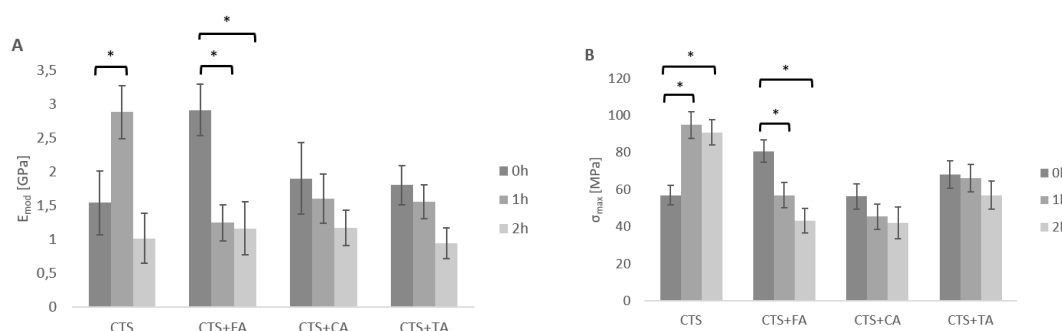
właściwościach powierzchniowych, ze względu na procesy fotodegradacji oraz fotosieciowania.

Właściwości mechaniczne filmów

Jednym z nadrzędnych celów modyfikacji materiałów chitozanowych dodatkiem związków fenolowych była poprawa właściwości mechanicznych materiałów względem materiałów niemodyfikowanych. Właściwości mechaniczne filmów są istotne pod kątem ich praktycznego wykorzystania jako materiały opatrunkowe. Po pierwsze, materiały opatrunkowe muszą być wystarczająco wytrzymałe, aby wytrzymać manipulacje podczas aplikacji i zabezpieczyć obszar ranowy przed zewnętrznymi czynnikami, takimi jak ruchy ciała czy kontakt z ubraniem. Po drugie, silne właściwości mechaniczne są niezbędne dla utrzymania integralności opatrunku przez cały okres jego noszenia, co przyczynia się do skuteczności procesu gojenia się rany. Dlatego właśnie właściwości mechaniczne filmów są kluczowe dla ich funkcjonalności i skuteczności jako materiałów opatrunkowych.

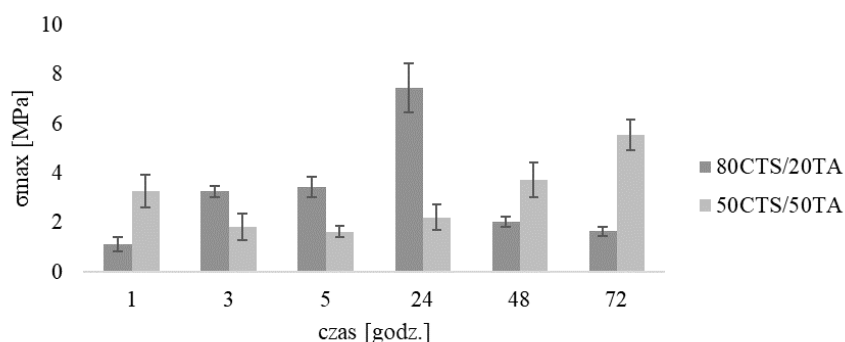
Na podstawie uzyskanych wyników zauważyłam, że dodatek związków fenolowych do chitozanu zwiększa wartość modułu Younga oraz maksymalnej wytrzymałości na rozciąganie uzyskanych filmów w porównaniu z materiałami chitozanowymi niemodyfikowanymi związkami fenolowymi (wykres 3). Związki fenolowe mogą wpływać na zmianę układu łańcucha polimerowego ze względu na tworzące się wiązania wodorowe między grupami hydroksylowymi obecnymi w strukturze związków fenolowych a grupami hydrofilowymi, takimi jak grupy aminowe oraz hydroksylowe, znajdującymi się w strukturze chitozanu. Ekspozycja materiałów na promieniowanie UVC nieznacznie wpływa na wartość modułu Younga filmów CTS i CTS+FA po 1 godzinie oraz CTS+FA i CTS+TA po 2 godzinach ekspozycji na promieniowanie UVC [H2]. W przypadku chitozanu niemodyfikowanego wartość modułu Younga wzrosła dwukrotnie po 1 godzinie, ze względu na zajście procesu fotosieciowania. Ekspozycja materiału chitozanowego niemodyfikowanego związkami fenolowymi przez 1 i 2 godziny powoduje poprawę maksymalnej wytrzymałości na rozciąganie. Ekspozycja materiałów na działanie promieniowania UVC przyczynia się do nieznacznego pogorszenia parametrów mechanicznych w związku z zachodzeniem procesu fotodegradacji. Zauważyłam, że w przypadku filmów uzyskanych z czystego chitozanu głównie zachodzi proces fotosieciowania, co przyczynia się do polepszenia właściwości mechanicznych filmów w wyniku ekspozycji na promieniowanie UVC. Po dodaniu kwasów fenolowych zaobserwowałam przewagę procesu fotodegradacji, ponieważ ekspozycja grup

funkcyjnych chitozanu jest niższa niż w przypadku chitozanu niemodyfikowanego, co zmniejsza liczbę tworzących się małowcząsteczkowych produktów, które następnie odparowują z powierzchni.

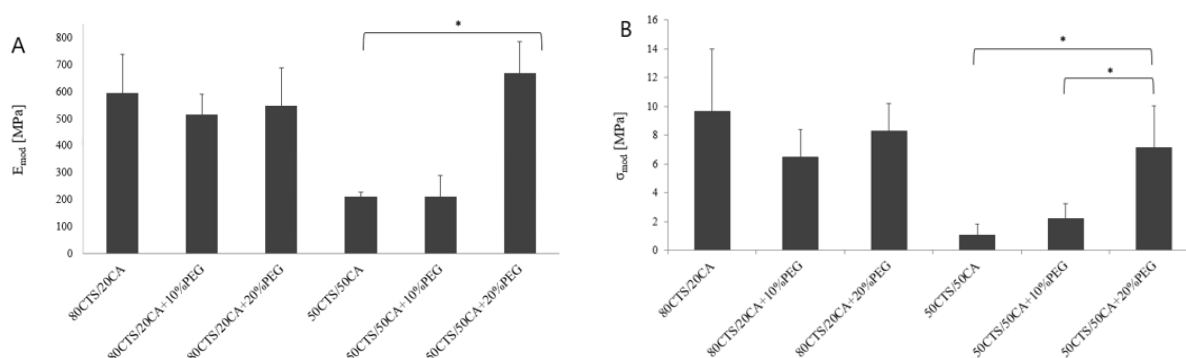


Wykres 3. Moduł Younga (A) i maksymalna wytrzymałość na rozciąganie (B) filmów na bazie chitozanu (CTS) z kwasem ferulowym (FA), kawowym (CA) i taninowym (TA) próbek nienaświetlanych (0h) i naświetlanych przez 1 (1h) i 2 godziny (2h) [H2]

Celem określenia właściwości mechanicznych filmów, wykonałam także badanie ich parametrów mechanicznych filmów po zanurzeniu w roztworze SBF (ang. simulated body fluid, symulowanym płynie ustrojowym) na 24, 48 oraz 72 godziny (wykres 4) [H3]. Filmy na bazie chitozanu bez dodatku kwasu taninowego uległy degradacji zaraz po zanurzeniu. Dla pozostałych materiałów maksymalna wytrzymałość na rozciąganie była różna w zależności od czasu zanurzenia. Dla próbek na bazie chitozanu i kwasu taninowego w stosunku 80/20 zaobserwowałam wzrost maksymalnej wytrzymałości na rozciąganie przez pierwsze 24 godziny. Dla kolejnych czasów zanurzenia wartość ta zmalała. Dla próbek chitozanu i kwasu taninowego w stosunku 50/50 najpierw zaobserwowałam spadek maksymalnej wytrzymałości na rozciąganie, a po zanurzeniu na 48 godzin jej wzrost. Ten rodzaj materiału ma niższą zawartość chitozanu, dzięki czemu nie jest tak podatny na pęcznienie jak materiał otrzymany z mieszaniny chitozanu i kwasu taninowego w stosunku 80/20. Z zanurzonych filmów uwalnia się kwas taninowy, co skutkuje ciemnieniem roztworu SBF. Jednocześnie chitozan ulega solwatacji przez cząsteczki wody, co prowadzi do poprawy parametrów mechanicznych. Maksymalną wartość σ_{max} zaobserwowałam po 72 godzinach zanurzenia w SBF. Po kolejnych 24 godzinach zanurzenia wszystkie próbki uległy zniekształceniu i nie było możliwości kontynuowania badań.



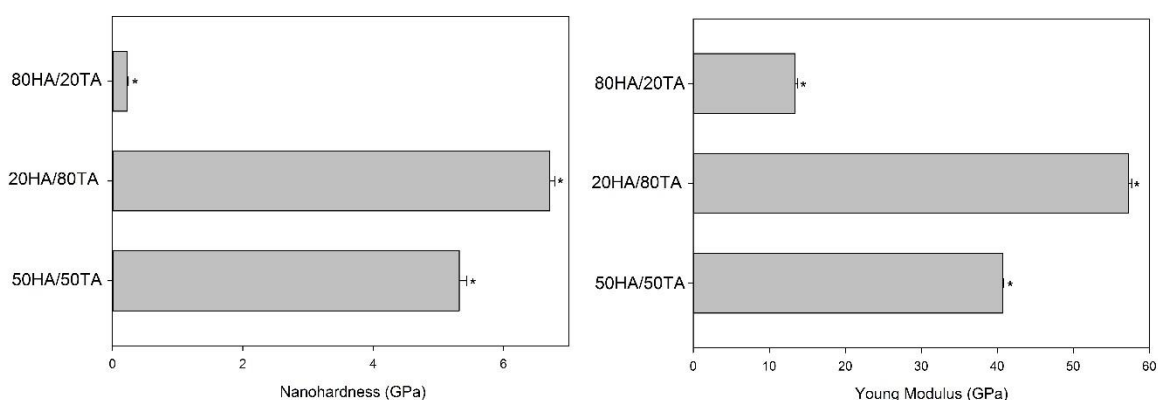
Wykres 4. Maksymalna wytrzymałość na rozciąganie (σ_{max}) mierzona dla badanych filmów po zanurzeniu w SBF na 1, 3, 5, 24, 48 i 72 godziny [H3]



Wykres 5. Moduł Younga (A) oraz maksymalna wytrzymałość na rozciąganie (B) zmierzona dla filmów chitozanowych modyfikowanych kwasem kawowym z dodatkiem glikolu polietylenowego [H4]

Parametry mechaniczne zostały także przeze mnie wyznaczone dla filmów chitozanowych modyfikowanych kwasem kawowym (w stosunku 80/20 oraz 50/50) z dodatkiem glikolu polietylenowego (10 i 20% wag.) (wykres 5) [H4]. Zaobserwowałam spadek wartości modułu Younga oraz maksymalnej wytrzymałości na rozciąganie wraz ze zmniejszeniem ilości chitozanu w materiale, jednak dodatek glikolu polietylenowego przyczynił się do poprawy właściwości mechanicznych filmów. Można zatem stwierdzić, że zwiększenie ilości kwasu kawowego w stosunku do chitozanu prowadzi do pogorszenia parametrów mechanicznych filmów, ponieważ w wyniku zanurzenia kwas kawowy jest uwalniany z materiałów, a jednocześnie chitozan jest solwatowany przez cząsteczki wody. Z kolei wykonanie dodatkowej modyfikacji filmów, poprzez wprowadzenie glikolu polietylenowego, przyczynia się do wzrostu wartości modułu Younga oraz maksymalnej wytrzymałości na rozciąganie materiałów, ponieważ uwalnianie kwasu kawowego jest ograniczone przez obecność glikolu polietylenowego.

Parametry mechaniczne filmów, takie jak nanotwardość i moduł Younga, wyznaczyłam metodą nanoindentencji filmów na bazie kwasu hialuronowego oraz kwasu taninowego (wykres 6) [H6]. Stosunek kwasu hialuronowego do kwasu taninowego w istotny sposób wpływał na oba badane parametry mechaniczne. Wzrost zawartości kwasu taninowego znacząco poprawia odporność mechaniczną i zwiększa moduł Younga, natomiast odwrotny efekt zaobserwowałam w przypadku zwiększenia zawartości kwasu hialuronowego. Wynika to z ilości tworzących się oddziaływań pomiędzy grupami funkcyjnymi obu komponentów.



Wykres 6. Właściwości mechaniczne badane metodą nanoindentencji filmów otrzymanych z mieszaniny kwasu hialuronowego oraz kwasu taninowego w stosunku 80/20, 50/50, 20/80 [H6]

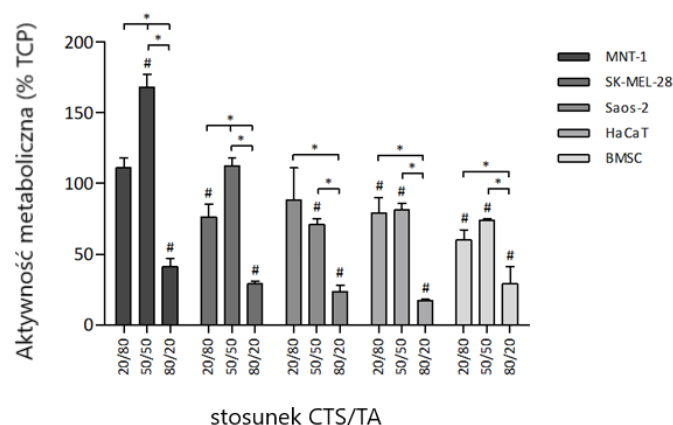
Podsumowując, modyfikacja chitozanu poprzez dodatek związków fenolowych prowadzi do poprawy właściwości mechanicznych materiałów co sugeruje, że tego typu modyfikacja może być korzystna w kontekście ich zastosowań. Ekspozycja materiałów na działanie promieniowania UVC przyczynia się do nieznacznego pogorszenia parametrów mechanicznych. Właściwości mechaniczne filmów po zanurzeniu w SBF zmieniały się w czasie. Największą różnicę wartości maksymalnej wytrzymałości na rozciąganie uzyskaną dla badanych materiałów zaobserwowałam po 24 godzinach od zanurzenia. Wykonanie dodatkowej modyfikacji filmów na bazie chitozanu z kwasem kawowym poprzez wprowadzenie glikolu polietylenowego przyczynia się do wzrostu modułu Younga oraz maksymalnej wytrzymałości na rozciąganie uzyskanych materiałów. Z kolei najwyższą wartość nanotwardości i modułu Younga, wyznaczonych metodą nanoindentencji, wykazał film na bazie kwasu hialuronowego oraz kwasu taninowego w stosunku 20HA/80TA. W wyniku deformacji materiału poprzez działanie wglębnika, wiązania wodorowe między kwasem hialuronowym a kwasem taninowym zostają zerwane i natychmiast tworzą się nowe wiązania, co wpływa na polepszenie integralności strukturalnej uzyskanego materiału.

Właściwości biologiczne uzyskanych filmów

Badanie żywotności komórek

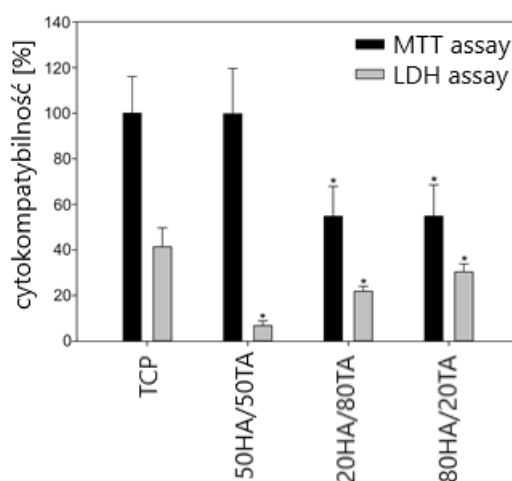
Mając na uwadze jak ważne są badania biogodności w związku z potencjalnym wykorzystaniem otrzymanych przeze mnie materiałów jako materiały opatrunkowe lub powłoki implantów metalicznych, nawiązałam współpracę z prof. dr hab. Anną Osyczką (Uniwersytet Jagielloński), dr hab. Konradem Kleszczyńskim (University of Münster, Niemcy) oraz dr Marcinem Wekwejem (Politechnika Gdańska). Umożliwiło mi to ich wykonanie. Osobiście nadzorowałam prowadzenie badań biologicznych, dostarczałam materiały do analiz, podejmowałam decyzje dotyczące metod sterylizacji, wyboru rodzaju komórek oraz selekcji testów, a także wspólnie z zespołem naukowym interpretowałam uzyskane rezultaty.

Podczas prowadzonych badań zbadalam odpowiedź komórkową na otrzymane materiały chitozanowe zawierające kwas taninowy w stosunku 80/20, 50/20 oraz 20/80. Badania wykonałam z wykorzystaniem różnych typów komórek, takich jak pierwotne ludzkie mezenchymalne komórki pochodzenia szpikowego (BMSC), HaCaT (spontanicznie transformowane aneuploidalne nieśmiertelne komórki keratynocytów), MNT-1 (ludzki czerniak wysokopigmentowany), SK-MEL-28 (ludzki złośliwy czerniak amelanotyczny) oraz Saos-2 (ludzki kostniakomięsak). Pozwoliło to na określenie czy materiał wykazuje zróżnicowany wpływ na żywotność komórek w zależności od typu linii komórkowej [H1]. Uzyskane wyniki wskazały na wyższą żywotność komórek w kontakcie z materiałami otrzymanymi z chitozanu i kwasu taninowego w stosunku 20/80 oraz 50/50, w porównaniu z materiałami w stosunku 80/20 (wykres 7). Z kolei żywotność komórek nowotworowych MNT-1 oraz SK-MEL-28 na poziomie 30-40% w kontakcie z materiałem 80CTS/20TA wskazuje, że mogą one być skuteczne w przypadku terapii nowotworowych.



Wykres 7. Aktywność metaboliczna różnych typów komórek (MNT-1, SK-MEL-28, Saos-2, HaCaT, BMSC) hodowanych przez 6 dni na materiałach na bazie chitozanu oraz kwasu taninowego [H1]

Filmy otrzymane z mieszaniny kwasu hialuronowego oraz kwasu taninowego w stosunku 80/20 oraz 20/80 zahamowały wzrost komórek hFOB 1.19 o ~50%, ale nie były cytotoksyczne, ponieważ uwalnianie LDH nie było podwyższone (wykres 8) [H6]. Z kolei film na bazie mieszaniny 50HA/50TA okazał się być najbardziej cytokompatybilny, ponieważ nie zmniejszał wzrostu komórek ani nie powodował zwiększenia uwalniania LDH w stosunku do kontroli.



Wykres 8. Wpływ filmów otrzymanych z mieszaniny kwasu hialuronowego oraz kwasu taninowego w stosunku 80/20, 50/50, 20/80, na cytokompatybilność komórek hFOB 1.19 (żywotność komórek i uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej) po 72h hodowli [H6]

Najwyższą żywotność komórek na poziomie 170% dla SK-MEL-28, 110% dla SK-MEL-28, 80% dla HaCaT, oraz 70% dla BMSC, uzyskałam dla materiałów otrzymanych z mieszaniny chitozanu, oraz kwasu taninowego w stosunku 50/50. Z kolei spośród materiałów zawierających kwas hialuronowy najwyższą żywotność komórek hFOB 1.19 zaobserwowałam w przypadku materiałów zawierających kwas taninowy w stosunku 50/50 do kwasu hialuronowego. Świadczy to o poprawie cytokompatybilności materiałów w wyniku ich modyfikacji dodatkiem kwasu taninowego.

Właściwości przeciwbakteryjne filmów

W ramach prowadzonych badań oceniłam hamowanie rozwoju bakterii w kontakcie z materiałem, jak również określiłam, czy ekspozycja materiałów na promieniowanie UVC wpływa na rozwój bakterii na ich powierzchni [H2]. Hamowanie wzrostu bakterii oceniałam poprzez pomiar zmętnienia hodowanego bulionu bakteryjnego z użyciem badanych materiałów, według standardów McFarlanda [14]. Dodatek związków fenolowych nie wpłynął na zahamowanie wzrostu bakterii *Staphylococcus aureus*. W przypadku filmów naświetlanych promieniowaniem UVC zaobserwowałam poprawę właściwości przeciwbakteryjnych filmów z dodatkiem kwasu taninowego oraz kwasu ferulowego, zarówno dla naświetlania przez 1, jak i 2 godziny. W przypadku *Escherichia coli* filmy na bazie chitozanu zawierającego kwas kawowy i ferulowy charakteryzowały się znacznie większym zahamowaniem rozwoju bakterii w porównaniu do filmów bez dodatku kwasów fenolowych.

Analizując uzyskane wyniki hamowania wzrostu bakterii po ekspozycji materiałów na działanie promieniowania UVC zaobserwowałam polepszenie właściwości antybakteryjnych otrzymanych filmów polimerowych. Badania pozwoliły zatem potwierdzić skuteczność sterylizacji filmów chitozanowych modyfikowanych wybranymi związkami fenolowymi (kwasem kawowym, taninowym oraz ferulowym) z wykorzystaniem promieniowania UVC o długości fali 254 nm.

Kolejne etapy badań dotyczyły filmów chitozanowych modyfikowanych kwasem taninowym, które poddałam badaniom z wykorzystaniem bakterii *Staphylococcus aureus* [H3]. Hamowanie wzrostu bakterii oceniałam według standardów McFarlanda [14]. W przypadku bakterii inkubowanych w kontroli (bez filmu) zaobserwowałam ich szybkie namnażanie do 4 MSi w ciągu 4 godzin, co odpowiada 12×10^8 CFU/ml. Podobne wyniki uzyskałam dla filmów 50CTS/50TA. Natomiast w przypadku innych materiałów (100CTS i 80CTS/20TA) wzrost bakterii był spowolniony. Dla przybliżenia skali oszacowałam, że filmy hamują wzrost bakterii

o 14% i 25% przy 2-godzinnej inkubacji, co odpowiada około $1,2 \times 10^8$ CFU i $2,2 \times 10^8$ CFU (tabela 4). Istotne zahamowanie wzrostu bakterii w początkowej fazie inkubacji z materiałem odnotowałam przy większej zawartości chitozanu.

Tabela 4. Wpływ materiału na ilość bakterii *Staphylococcus aureus* [H3]

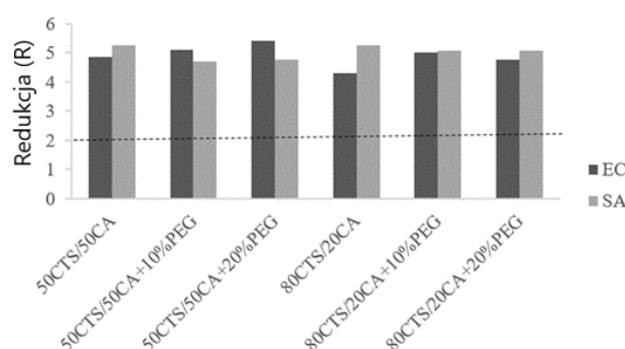
Czas [godz.]	<i>Staphylococcus aureus</i>			
	Kontrola	Próbka		
		100CTS	80CTS/20TA	50CTS/50TA
0	1,5			
2	2,93	2,14 ^{#*}	2,51 ^{#*}	2,85 ^{#*}
4	>4	3,47 ^{#*}	3,86 ^{#*}	>4
6	>4	>4	>4	>4

Pomimo udokumentowanej aktywności przeciwbakteryjnej kwasu taninowego [15] otrzymane wyniki badań świadczą o przeważającej aktywności chitozanu w badanych materiałach. Według literatury chitozan wykazuje właściwości bakteriobójcze [16–18]. Istnieją trzy proponowane modele zrozumienia przeciwdrobnoustrojowego działania chitozanu. Pierwszym z nich jest interakcja między kationami a ujemnie naładowanymi błonami komórkowymi drobnoustrojów. W interakcji pośredniczą grupy NH_3^+ i aniony, prawdopodobnie poprzez konkurowanie z Ca^{2+} o miejsca elektroujemne na powierzchni membrany. Sprzyja to zmianom właściwości błony i hamuje rozwój bakterii. Innym proponowanym mechanizmem jest wiązanie chitozanu z DNA drobnoustroju i hamowanie syntezy mRNA i białek. Trzecim mechanizmem jest chelatacja metali, supresja pierwiastków zarodnikowych i wiązanie składników odżywczych niezbędnych do wzrostu drobnoustrojów [19]. Dokładny mechanizm działania nie jest znany, jednak aktywność przeciwdrobnoustrojowa chitozanu w pierwszych godzinach po implantacji odgrywa kluczową rolę w ograniczaniu infekcji. Jest to szczególnie ważne, ponieważ wystąpienie infekcji może skutkować odrzuceniem implantu i późniejszą reoperacją [20]. W związku z aktywnością przeciwbakteryjną chitozanu istotne jest wykorzystanie związków sieciujących, które nie będą hamować lub neutralizować tego efektu. Badania wykazały, że wprowadzenie do matrycy chitozanowej związków fenolowych, nie wpływa na inhibicję aktywności przeciwbakteryjnej chitozanu.

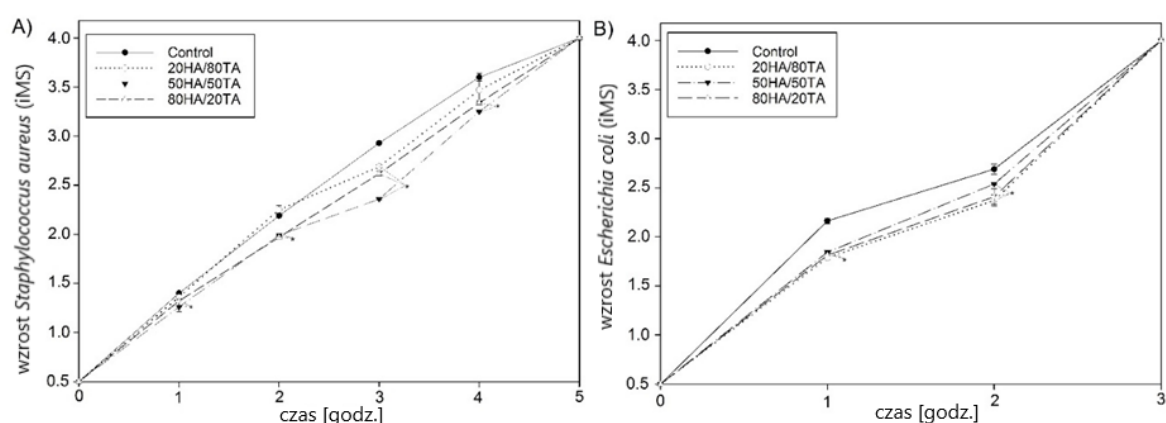
Dodatkowo dokonałam oceny biofilmu utworzonego po zanurzeniu materiałów w roztworze bakteryjnym *Staphylococcus aureus*. Biofilm został przeze mnie zbadany za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego. Na powierzchni filmów 50CTS/50TA i 80CTS/20TA zaobserwowałam bakterie oraz utworzenie biofilmu. Okazało się jednak, że im

więcej chitozanu zawierał materiał, tym mniej bakterii było obecnych na powierzchni materiałów. Uzyskane wyniki dotyczące wpływu chitozanu na blokowanie adhezji bakterii są zgodne z literaturą [21–23].

Podjęłam także próbę określenia aktywności przeciwbakteryjnej kwasu kawowego jako modyfikatora materiału na bazie chitozanu zawierającego także glikol polietylenowy [H4]. W wyniku inkubacji materiałów przez 24 godziny stwierdziłam redukcję liczby żywych bakterii w wymaganym zakresie ($R \geq 2$), co oznacza, że wszystkie badane materiały mają właściwości bakteriobójcze (wykres 9).



Wykres 9. Działania bakteriobójcze wobec *Staphylococcus aureus* (SA) oraz *Escherichia coli* (EC). Linia przerywaną określono minimalny zakres, by zaklasyfikować materiały jako bakteriobójcze [H4]



Wykres 10. Zahamowanie wzrostu bakterii podczas inkubacji z filmami otrzymanymi z mieszaniny kwasu hialuronowego oraz kwasu taninowego w stosunku 80/20, 50/50, 20/80: A) *Staphylococcus aureus* i B) *Escherichia coli* [H6]

Filmy otrzymane z mieszaniny kwasu hialuronowego oraz kwasu taninowego wykazywały właściwości przeciwbakteryjne zarówno wobec *Staphylococcus aureus*, jak i *Escherichia coli* i przyczyniły się do spowolnienia ich wzrostu (wykres 10) [H6]. Zaobserwowałam, że filmy otrzymane z mieszaniny 20HA/80TA uległy całkowitemu rozpuszczeniu w trakcie testu, co może mieć wpływ na uzyskane wyniki. Najskuteczniejsze działanie hamujące na *Staphylococcus aureus* (~10%) zaobserwowano dla filmów 50HA/50TA, natomiast na *Escherichia coli* (~14%) - dla filmów 20HA/80TA.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, iż filmy zawierające związki fenolowe, takie jak kwas taninowy, kwas ferulowy oraz kwas kawowy wykazują aktywność przeciwbakteryjną, zarówno wobec szczepów bakterii gram dodatnich, jak i ujemnych. Aktywność ta jest podyktowana występowaniem wiązań wodorowych, których zerwanie powoduje uwalnianie związków fenolowych odpowiedzialnych za aktywność przeciwbakteryjną. Uzyskane wyniki wskazują na odpowiedni dobór metody otrzymywania filmów, jak i doboru czynników sieciujących, których uwalnianie z matrycy jest możliwe i warunkuje ich aktywność przeciwbakteryjną.

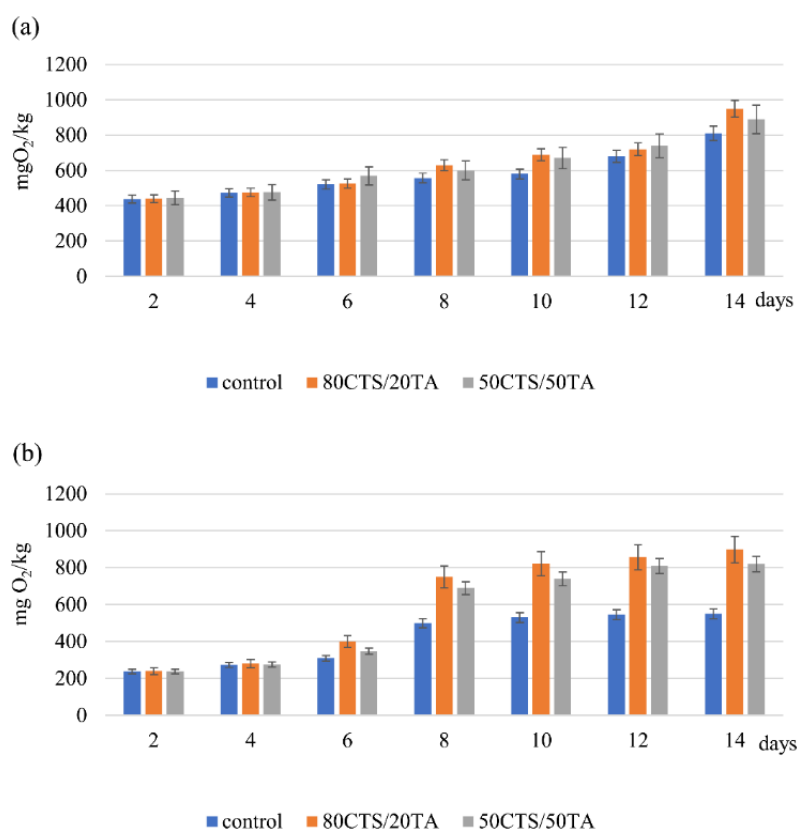
Dodatkowo ekspozycja materiałów na działanie promieniowania UVC wpływa pozytywnie na właściwości przeciwbakteryjne otrzymanych filmów polimerowych, poprzez zmianę parametrów powierzchniowych materiałów na drodze fotosieciowania. W rezultacie, osiągnęłam efekt synergii między promieniowaniem UVC a zastosowanymi związkami fenolowymi oraz ako pierwsza dokonałam porównania aktywności przeciwbakteryjnej wykorzystanych środków sieciujących w odniesieniu do materiałów biopolimerowych.

Biodegradacja filmów chitozanowych modyfikowanych kwasem taninowym

Kontynuując badania z udziałem mikroorganizmów, zbadalam ich rolę w wybranych środowiskach (gleba i kompost) w procesie biodegradacji materiałów na bazie chitozanu i kwasu taninowego [H5], co jest istotne przy rozważaniach możliwości utylizacji otrzymanych przeze mnie materiałów. Badania były prowadzone we współpracy z dr hab. Marią Swiontek Brzezinską, prof. UMK (Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych UMK). Osobiście nadzorowałam prowadzenie badania, dostarczałam materiały do analiz, podejmowałam decyzje dotyczące metod warunków procesu, a także wspólnie z dr hab. Marią Swiontek Brzezinską interpretowałam uzyskane rezultaty.

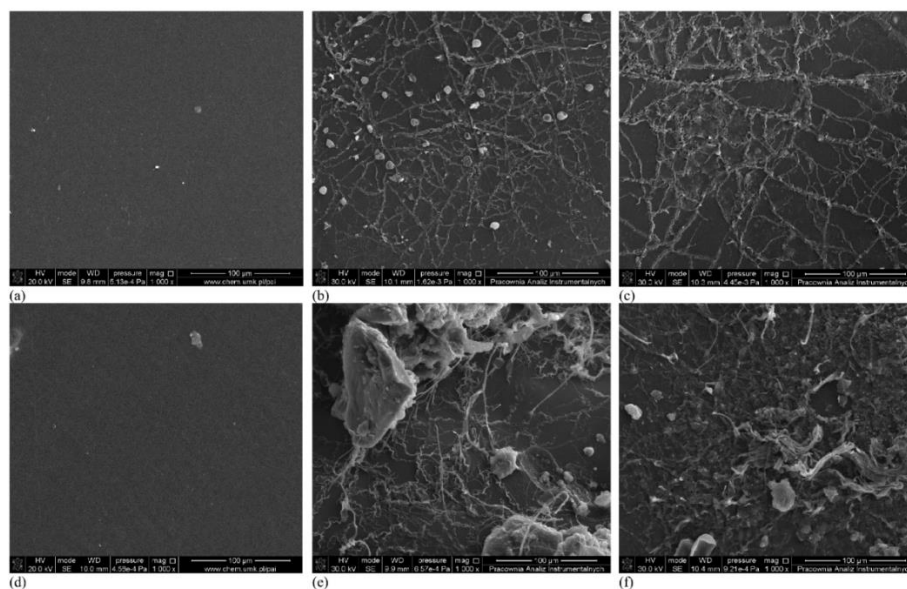
Biodegradację filmów przeprowadzono metodą respirometryczną z wykorzystaniem aparatury OxiTop. Zbadalam także adhezję mikroorganizmów do powierzchni materiałów

wykonując obserwację skaningowym mikroskopem elektronowym. Kolejnym etapem była identyfikacja bakterii, które znajdowały się na powierzchni filmów. W wyniku prowadzonych badań stwierdziłam, że ilość tlenu potrzebna mikroorganizmom w glebie i kompoście wzrastała wraz z wydłużaniem się czasu inkubacji (wykres 11). Badane materiały ulegały degradacji w różnym tempie i w różnym stopniu zależnie od środowiska, zarówno w glebie jak i kompoście. Po 14 dniach od rozpoczęcia procesu biodegradacji zaobserwowałam tworzenie się biofilmu na filmach w glebie i kompoście.



Wykres 11. Biologiczne zapotrzebowanie tlenu przez mikroorganizmy w glebie (a) i kompoście (b) w obecności filmów 50CTS/50TA i 80CTS/20TA [H5]

Przy pomocy obrazowania skaningowym mikroskopem elektronowym zaobserwowałam zmiany, które wynikały z adhezji mikroorganizmów do filmów oraz ich uszkodzenia, będące wynikiem ich aktywności metabolicznej bakterii. Najmniejsze zmiany zaobserwowałam dla materiału otrzymanego z chitozanu i kwasu taninowego w stosunku 80/20 (rysunek 2).



Rysunek 2. Zdjęcia SEM filmów: 50CTS/50TA przed biodegradacją (a), 50CTS/50TA podczas degradacji w glebie (b), 50CTS/50TA podczas degradacji w kompoście (c), 80CTS/20TA przed biodegradacją (d), 80CTS/20TA podczas degradacji w glebie (e), 80CTS/20TA podczas degradacji w kompoście (f), powiększenia 1000x [H5]

Wykonałam także analizę FTIR-ATR w celu określenia w jaki sposób dochodzi do degradacji materiału [H5]. Na widmie, które wykonałam dla filmów otrzymanych z chitozanu i kwasu taninowego przed degradacją zaobserwowałam pasmo przy 1289 cm^{-1} , odpowiadające wiązaniu C-O-C, wchodzącemu w skład łańcucha polimerowego. Po degradacji mikrobiologicznej pasmo jest nadal obecne, jednak ma inny kształt, co może sugerować, że to wiązanie zostało przerwane w wyniku działania mikroorganizmów. Inna zmiana dotyczyła pasma przy 1021 cm^{-1} charakterystyczne dla grup COH i CH₂OH. Liczba falowa wzrosła po procesie degradacji dla każdego rodzaju mikroorganizmu (GCTS1, GCTS2, KCTS2), a intensywność zwiększyła się. Według mnie wzrosła liczba tych grup, co świadczy o degradacji łańcucha polimerowego. Dodatkowo zidentyfikowałam szczepy bakterii odpowiedzialne za degradację materiałów, na podstawie analizy sekwencji genu kodującego 16S rRNA (tabela 5).

Tabela 5. Identyfikacja bakterii tworzących biofilm na powierzchni materiałów [H5]

Szczep	Pochodzenia szczepu
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> GTA2	szczoney wyizolowane z biofilmu
<i>Bacillus mycoides</i> GTA7	próbkki 50CTS/50TA podczas
<i>Pseudomonas arsenicoxydans</i> GTA8	biodegradacji w glebie
<i>Pseudomonas laurylsulfativorans</i> GTA9	
<i>Pseudomonas hunanensis</i> KTA1	szczoney wyizolowane z biofilmu
<i>Pseudomonas psychrophila</i> KTA3	próbkki 50CTS/50TA podczas
	biodegradacji w kompoście
<i>Pseudomonas mohnii</i> GCTS1	szczoney wyizolowane z biofilmu
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> GCTS2	próbkki 80CTS/20TA podczas
<i>Brevibacillus laterosporus</i> GCTS9	biodegradacji w glebie
<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i> KCTS2	szczoney wyizolowane z biofilmu
<i>Stenotrophomonas humi</i> KCTS3	próbkki 80CTS/20TA podczas
	biodegradacji w kompoście

Omówione powyżej badania dotyczące biodegradacji pozwalają stwierdzić, iż materiały na bazie chitozanu oraz kwasu taninowego są trudne w degradacji. Dzieje się tak, ponieważ kwas taninowy oraz chitozan wykazują działanie przeciwbakteryjne, przez co aktywność bakterii w odniesieniu do degradacji materiałów jest zahamowana. Identyfikacja szczepów bakterii pozwoliłaby w przyszłość na opracowanie preparatu przyspieszającego degradację tego typu materiałów.

Właściwości fizykochemiczne materiałów w formie skafoldów

Badania nad charakterystyką filmów biopolimerowych modyfikowanych związkami fenolowymi potwierdziły uzyskanie właściwości, które są cenne w kontekście ich medycznego zastosowania. Rozwijając projektowanie i produkcję materiałów do inżynierii tkankowej, opracowałam materiały biopolimerowe w formie skafoldów, modyfikowanych związkami fenolowymi, wykorzystując przy tym technikę liofilizacji.

Badania nad charakterystyką filmów biopolimerowych modyfikowanych związkami fenolowymi potwierdziły uzyskanie właściwości cennych dla ich medycznego zastosowania. Idąc naprzeciw zapotrzebowaniu na nowoczesne materiały do inżynierii tkankowej,

opracowałam biopolimerowe skafoldy, modyfikowane związkami fenolowymi, z myślą o ich potencjalnym zastosowaniu jako rusztowania dla tkanki miękkiej, korzystając z techniki liofilizacji.

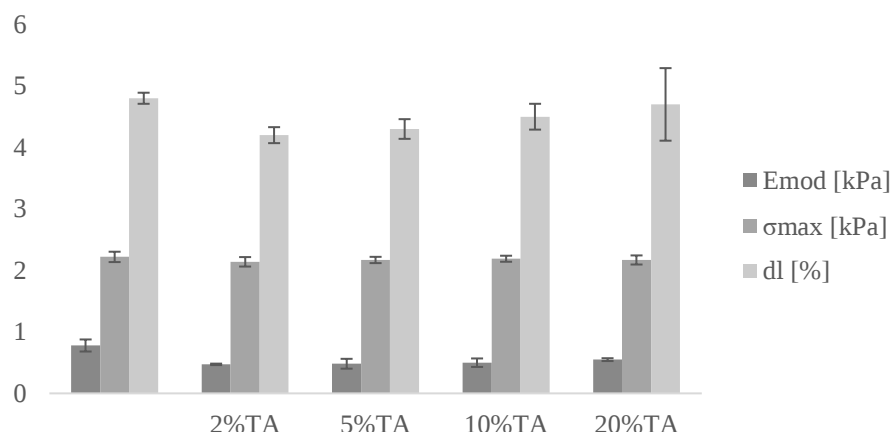
Właściwości mechaniczne skafoldów

Właściwości mechaniczne skafoldów wyznaczyłam poprzez ściskanie próbek z użyciem maszyny wytrzymałościowej. Wyniki uzyskane dla materiałów chitozanowych modyfikowanych związkami fenolowymi wskazują na wzrost parametrów mechanicznych, takich jak moduł Younga oraz maksymalna siła ściskająca. W wyniku modyfikacji chitozanu kwasem galusowym (GA) odnotowałam wzrost wartości modułu Younga o ponad 11 kPa. W przypadku dodatku kwasu ferulowego (FA) parametr ten wzrósł o 8 kPa, a dodatek kwasu taninowego (TA) spowodował wzrost modułu Younga o 13 kPa (tabela 6). Najwyższą wartość maksymalnej siły ściskającej wykazały materiały chitozanowe zawierające kwas galusowy [H7].

Tabela 6. Parametry mechaniczne uzyskane dla skafoldów takie jak moduł Younga (E_{mod}) oraz maksymalną siłę ściskającą (F_{max}) [H7]

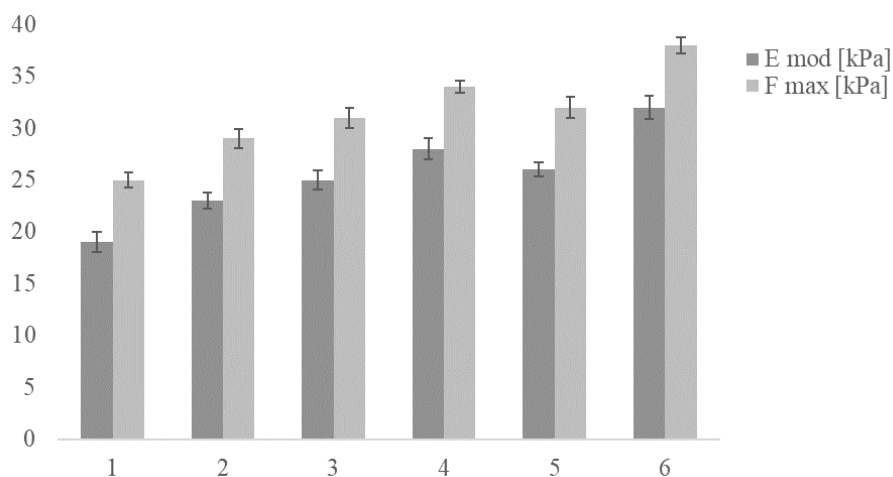
Próbka	E_{mod} [kPa]	F_{max} [N]
CTS	$19,41 \pm 0,21$	$0,75 \pm 0,09$
CTS+GA	$30,61 \pm 0,17$	$1,28 \pm 0,02$
CTS+FA	$27,74 \pm 0,12$	$0,97 \pm 0,11$
CTS+TA	$32,42 \pm 0,35$	$1,21 \pm 0,14$

Parametry mechaniczne oznaczyłam także dla porowatych materiałów chitozanowych modyfikowanych glioksałem, po zanurzeniu ich w roztworze kwasu taninowego o stężeniu 2, 5, 10 oraz 20% wag. (wykres 12) [H8]. Glioksal został przeze mnie zaproponowany jako środek sieciujący, ponieważ związki z grupy aldehydów są jednymi z najlepszych związków sieciujących polisacharydy, a glioksal charakteryzuje się mniejszą toksycznością niż aldehyd glutarowy [24]. Związki te mają zdolność do reagowania z grupami aminowymi znajdującymi się w łańcuchu polimerowym, z utworzeniem wiązań kowalencyjnych. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują na brak różnic we właściwościach mechanicznych skafoldów przed i po zanurzeniu w roztworze kwasu taninowego, co potwierdza jak skutecznym środkiem sieciującym jest glioksal.



Wykres 12. Parametry mechaniczne materiałów chitozanowych modyfikowanych glioksałem przed zanurzeniem oraz po zanurzeniu w roztworach TA o różnym stężeniu [H8]

Materiały chitozanowe zmodyfikowałam poprzez wprowadzenie do matrycy kolagenu (w stosunku 50/50), glikozaminoglikanów (5% wag.), kwasu taninowego (5 oraz 20% wag.) oraz bioszklą 45S5 (5 i 10% wag.) [H9]. Uzyskane wyniki (wykres 13) pozwoliły na wyciągnięcie wniosku, że im większa ilość kwasu taninowego obecnego w materiale, jak i bioszklą, tym lepsze parametry mechaniczne uzyskanych skafoldów. Dzieje się tak na skutek podwójnego sieciowania zachodzącego między polimerami a kwasem taninowym oraz bioszklą.



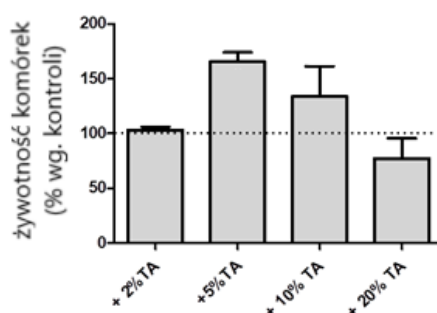
Wykres 13. Parametry mechaniczne wyznaczone dla skafoldów: 1- CTS/Coll+5%GAG+5%TA, 2-CTS/Coll+5%GAG+20%TA, 3- CTS/Coll+5%GAG+5%TA+5%bioszklą, 4-CTS/Coll+5%GAG+20%TA+5%b bioszklą, 5- CTS/Coll+5%GAG+5%TA+10% bioszklą, 6-CTS/Coll+5%GAG+20%TA+10% bioszklą [H9]

Analizując uzyskane wyniki, zauważyłam, że dodatek związków fenolowych polepsza właściwości mechaniczne badanych scaffoldów, takie jak moduł Younga oraz maksymalna siła ściskająca w porównaniu do materiałów niemodyfikowanych. Jest to wynikiem oddziaływań zachodzących między grupami funkcyjnymi biopolimerów a grupami funkcyjnymi obecnymi w strukturze związków fenolowych. Ponadto, wprowadzenie bioszklę do matryc polimerowych poprawiło ich parametry mechaniczne dzięki podwójnemu usieciowaniu materiału biopolimerowego. Mogę zatem wnioskować, że modyfikacja materiałów chitozanowo-kolagenowych w postaci scaffoldów poprzez dodatek kwasów fenolowych oraz bioszkieł przyczynia się do poprawy ich parametrów mechanicznych. Sieciowanie materiałów chitozanowych glioksałem charakteryzowały się stałymi wartościami modułu Younga oraz siły ściskającej, niezmiennymi po zanurzeniu materiałów w roztworach kwasu taninowego o różnych stężeniach.

Właściwości biologiczne uzyskanych scaffoldów

Badanie żywotności komórek

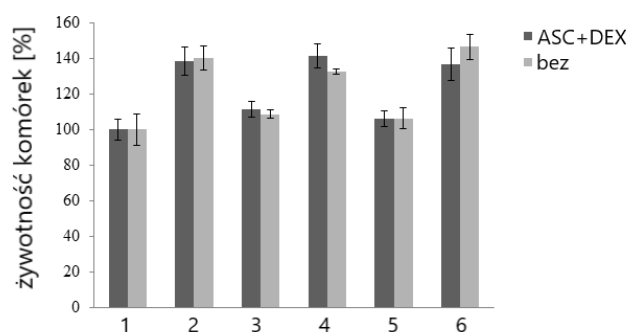
Wyniki badania żywotności komórek w kontakcie z materiałami chitozanowymi podwójnie usieciowanymi poprzez dodatek glioksalu oraz przez zanurzenie w roztworze kwasu taninowego o stężeniu roztworu 2, 5, 10 oraz 20% wag. w wodzie przedstawione są na wykresie 14 [H8]. Wyniki wskazują, że materiał po zanurzeniu w 20% roztworze kwasu taninowego wykazuje zwiększoną cytotoksyczność w stosunku do materiału kontrolnego zanurzonego w wodzie.



Wykres 14. Żywotność komórek hPDL na badanych hydrożelach po 24 godzinach hodowli.

Wyniki wyrażono jako % zmiany żywotności komórek w porównaniu z hydrożelem bez kwasu taninowego [H8]

Biokompatybilność materiałów na bazie chitozanu i kolagenu modyfikowanych kwasem taninowym, bioszkieł oraz glikozaminoglikanami wyizolowanymi ze skór rybich zbadanych dla komórek mezenchymalnych (MSC) za pomocą testu MTS. Prace były prowadzone w ramach badań wstępnych do projektu finansowanego z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach konkursu Tango V, którego byłam kierownikiem. Stwierdziłam wzrost żywotności komórek dla rusztowań z 20% dodatkiem kwasu taninowego w porównaniu do dodatku 5% o około 30% dla wszystkich badanych materiałów (wykres 15). Nie zauważyłam, aby obecność bioszkieła miała jakikolwiek wpływ na żywotność komórek w obecności kwasu taninowego. Ponadto żywotność komórek określona podczas eksperymentu z dodatkiem kwasu askorbinowego (ASC) i deksametazonu (DEX) nie wywołała istotnych zmian w przypadku rusztowań z kwasem taninowym i bez niego. Można zatem założyć, że odpowiedź komórek nie była stymulowana przez dodatek ASC i DEX. Jest to ciekawy aspekt i potwierdza, że rusztowania usieciowane kwasem taninowym są wysoce biokompatybilne [H9].



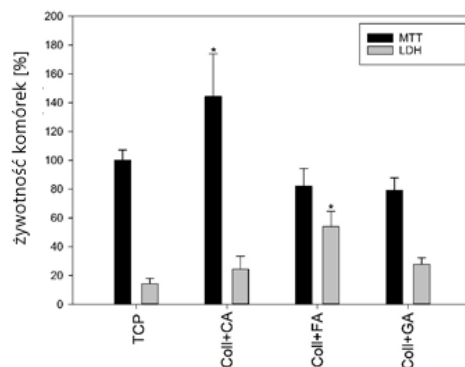
Wykres 15. Żywotność komórek MSC w kontakcie z materiałami: 1-

CTS/Coll+5%GAG+5%TA, 2-CTS/Coll+5%GAG+20%TA, 3-

CTS/Coll+5%GAG+5%TA+5%bioszkieło, 4-CTS/Coll+5%GAG+20%TA+5%bioszkieło, 5-

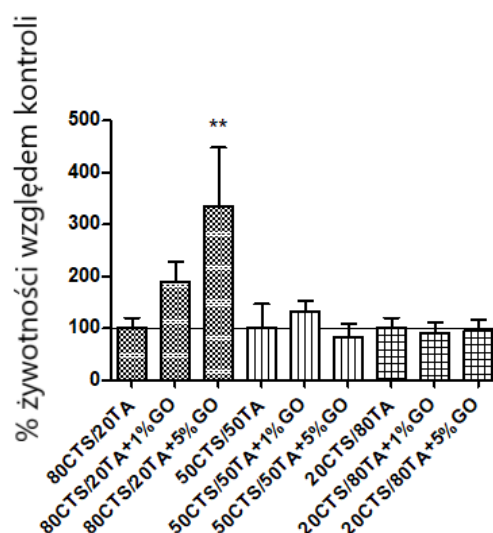
CTS/Coll+5%GAG+5%TA+10%bioszkieło, 6-CTS/Coll+5%GAG+20%TA+10%bioszkieło [H9]

Skafoldy na bazie kolagenu modyfikowanego różnymi związkami fenolowymi (kwasem kawowym, kwasem ferulowym oraz kwasem galusowym) poddałam analizie komórkowej celem określenia ich biokompatybilności (wykres 16) [H10]. Wyniki badań wskazują, że Coll+CA i Coll+GA nie wywierały działania cytotoksycznego na ludzką linię komórek osteoblastycznych hFOB 1.19. Z drugiej strony zaobserwowano wzrost żywotności komórek hodowanych na rusztowaniach wzbogaconych w kwas kawowy o 40% w stosunku do TCP. Skafoldy modyfikowane kwasem ferulowym (Coll+FA) okazały się cytotoksyczne dla komórek. Wystąpił znaczny wzrost uwalniania LDH z uszkodzonych komórek, któremu towarzyszył spadek wzrostu komórek.



Wykres 16. Żywność komórek MSC w kontakcie z materiałami otrzymanymi na bazie kolagenu (coll) modyfikowanego kwasem kawowym (CA), kwasem ferulowym (FA) oraz kwasem galusowym (GA) [H10]

Dla materiałów na bazie chitozanu oraz kwasu taninowego modyfikowanych glioksałem (2 i 5% wag.) określiłam cytotoksyczność z wykorzystaniem komórek (PDLSCs, komórki macierzyste więzadła ożębnowego) metodą *in vitro* (wykres 17) [H11]. W przypadku skafoldów na bazie chitozanu i kwasu taninowego w stosunku 80/20 dodatek glioksalu wpłynął na poprawę żywności komórek o 100% dla materiałów z 1% dodatku glioksalu, i aż trzykrotne zwiększenie żywności dla skafoldów z 5% dodatku glioksalu w stosunku do materiału bez glioksalu.



Wykres 17. Aktywność metaboliczna PDLSC hodowanych na rusztowaniach wykonanych z różnych proporcji (80/20, 50/50 lub 20/80) chitozanu i kwasu taninowego z 1 lub 5% dodatkiem glioksalu [H11]

Uzyskane wyniki wskazują, iż materiały chitozanowe modyfikowane glioksalem, po zanurzeniu w roztworze kwasu taninowego o stężeniach 2, 5, 10 oraz 20%, nie wykazały działania cytotoksycznego. Wprowadzenie kwasu taninowego do matrycy polimerowej na etapie przygotowania szkieletu również nie wpływa cytotoksycznie na materiał. Komórki w kontakcie z materiałami kolagenowymi z dodatkiem kwasu kawowego, kwasu ferulowego oraz kwasu galusowego wykazały żywotność na poziomie wyższym niż 70%, co świadczy o cytokompatybilności materiałów. Z kolei wykorzystanie glioksalu jako dodatkowego czynnika sieciującego materiały na bazie chitozanu oraz kwasu taninowego wpłynęło korzystnie na żywotność komórek, szczególnie w przypadku materiałów otrzymanych z mieszaniny chitozanu z kwasem taninowym w stosunku 80/20.

Badania kompatybilności szkieletów z krwią

Badania kompatybilności materiałów z krwią są istotne ze względu na potencjalne zastosowania tych materiałów w kontaktach z układem krwionośnym. Ocena kompatybilności obejmuje sprawdzenie, czy materiał nie wywołuje niepożądanych reakcji immunologicznych, oraz czy nie powoduje niepożądanych interakcji z czerwonymi krwinkami, wywołując hemolizę. Według normy ASTM F756-00 materiały wykazujące hemolizę powyżej 5% można zaklasyfikować jako hemolityczne, a zatem nie powinny mieć długotrwałego kontaktu z krwią [25]. Z kolei materiały wykazujące stopień hemolizy poniżej 2% można zaklasyfikować jako niehemolityczne, a materiały o stopniu hemolizy w zakresie 2-5% jako lekko hemolityczne.

Materiały chitozanowe modyfikowane kwasem taninowym oraz glioksalem poddano badaniom kompatybilności z krwią [H11]. Badania wykazały, iż wszystkie otrzymane materiały są niehemolityczne, odnosząc się do normy ASTM F756-00 wykazujące hemolizę poniżej 2%. Podobnie materiały chitozanowe modyfikowane kwasem galusowym, kwasem ferulowym oraz kwasem taninowym wykazały brak działania hemolitycznego [H7]. Materiały kolagenowe modyfikowane kwasem kawowym (CA), kwasem ferulowym (FA) oraz kwasem galusowym (GA) także wykazały brak działania hemolitycznego [H10].

Wszystkie materiały, które poddano badaniu ich kompatybilności z krwią, okazały się niehemolityczne. Mogą więc znaleźć zastosowanie w kontakcie z krwią, co ma miejsce w przypadku proponowanego ich zastosowania w inżynierii tkankowej.

Badanie biokompatybilności na modelu zwierzęcym

Prace eksperymentalne związane z określeniem biokompatybilności materiałów chitozanowych modyfikowanych wybranymi kwasami fenolowymi [H7] oraz materiałów kolagenowych z dodatkiem wybranych kwasów fenolowych [H10] poprzez implantowanie skafoldów w organizm zwierzęcy zostały wykonane we współpracy z prof. dr hab. Izabelą Polkowską (Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie) oraz dr hab. Iwoną Otrocką-Domagałą, prof. UWM (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie). Celem badań było potwierdzenie biozgodności otrzymanych przeze mnie materiałów pod kątem ich zastosowań w inżynierii tkankowej jako substytutów tkanek miękkich. Osobiście nadzorowałam prowadzenie badania na modelu zwierzęcym, dostarczałam materiały do analiz, podejmowałam decyzje dotyczące miejsca implantacji oraz metody sterylizacji, a także wspólnie z Iwoną Otrocką-Domagałą, prof. UWM interpretowałam uzyskane rezultaty.

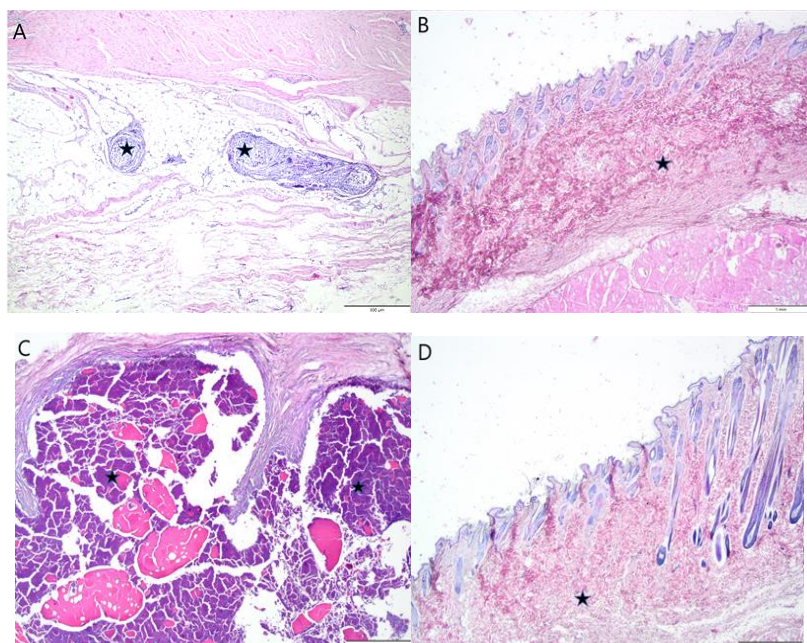
Materiały w formie skafoldów na bazie chitozanu modyfikowanego kwasem taninowym, ferulowym oraz galusowym, wykazujące biokompatybilność w warunkach *in vitro*, zostały zaimplantowane, w okolicy międzyżebrowej w tkance podskórnej królików rasy nowozelandzkiej [H7].

Badania histologiczne tkanek po implantacji wykazały w przypadku próby kontrolnej (materiału chitozanowego) w obrębie podskórnej tkanki tłuszczowej obecność fragmentu materiału włóknistego (fragmenty skafoldu). Fragment ten otoczony był umiarkowanym naciekiem limfocytów, makrofagów, umiarkowanie licznymi wielojądrzystymi komórkami olbrzymimi (typu ciała obcego) z proliferacją tkanki łącznej (rysunek 3).

W przypadku tkanki po implantacji materiału modyfikowanego kwasem galusowym nie zaobserwowano pozostałości skafoldów. W skórze zaobserwowano jednak ogniskową proliferację ubogą w komórki, natomiast bogatą w kolagen tkankę łączną, z późniejszym zanikiem przydatków (zwłóknieniem skóry). Sugeruje to, że rusztowanie zostało wchłonięte i zastąpione tkanką łączną. Tkanki podlegają zatem organizacji związanej z gojeniem i jej naprawą.

W przypadku materiałów modyfikowanych kwasem ferulowym zaobserwowano częściową resorpcję materiału. Duży implant umiejscowiony był w tkance podskórnej, otoczony naciekiem makrofagów, pojedynczych wielojądrowych komórek olbrzymich i neutrofili, limfocytów o zmiennej liczbie, z obwodową proliferacją tkanki łącznej.

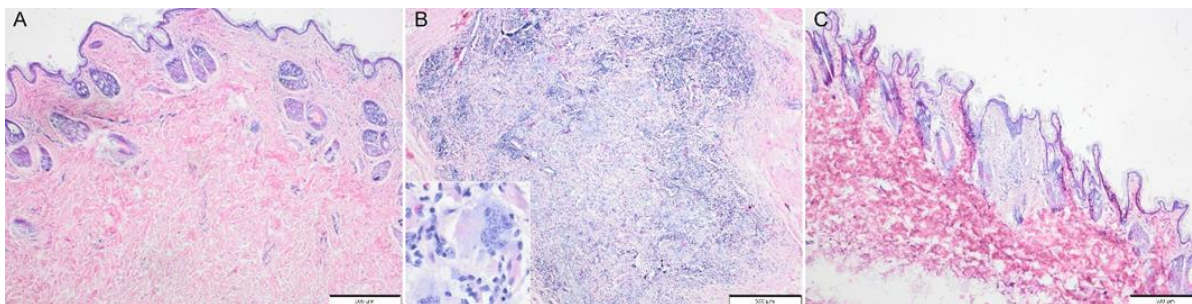
Po implantacji skafoldów modyfikowanych kwasem taninowym nie zaobserwowano fragmentów implantu. Wystąpiło zwłóknienie skóry z zanikiem przydatków.



Rysunek 3. Obraz tkanki z wszczepionym skafoldem. Próbką kontrolną – A) tkanka z wszczepionym materiałem chitozanowym (gwiazdki – fragmenty skafoldu, B) materiał chitozan/kwas galusowy (gwiazdka - tkanka łączna bogata w kolagen), C) chitozan/kwas ferulowy (gwiazdki – fragmenty skafoldu), D) chitozan/kwas taninowy (gwiazdka – późniejsze zwłóknienie skóry) [H7]

Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że wszystkie badane materiały są bezpieczne do stosowania medycznego, jednak rusztowania chitozanowe modyfikowane kwasem galusowym i taninowym były szybciej wchłaniane, a organizacja tkanki przebiega szybciej niż w obecności materiału modyfikowanego kwasem ferulowym.

Celem potwierdzenia biokompatybilności kwasów fenolowych przeprowadziłam badania rusztowań na bazie kolagenu modyfikowanych kwasem kawowym, ferulowym oraz galusowym [H10]. W przypadku kolagenu nie wykorzystałam dodatku kwasu taninowego, ponieważ wchodzi on w bardzo silne oddziaływanie z łańcuchem polimerowych kolagenu, tworząc strukturę żelową.



Rysunek 4. Tkanki pobrane po wszczepieniu skafoldów na bazie kolagenu u królików nowozelandzkich: A) Kolagen z kwasem kawowym (Coll+CA). W skórze właściwej widoczne jest łagodne zwłóknienie. Liczba przydatków w tym obszarze jest zmniejszona; B) Kolagen z kwasem ferulowym (Coll+FA). Obecne makrofagi, wielojądrzaste komórki olbrzymie, fagocytyрующие różowy materiał (elementy rusztowania - wstawka) i liczne limfocyty; C) Kolagen z kwasem galusowym (Coll+GA). Tuż pod naskórkiem występuje ogniskowy rozrost unaczynionej tkanki łącznej, umiarkowanie akantotyczny [H10]

Materiały wprowadzono do organizmu zwierzęcego analogicznie jak w przypadku materiałów chitozanowych. Podczas badania histologicznego próbek pobranych z miejsca wszczepienia materiału kolagenowego modyfikowanego kwasem kawowym zaobserwowano łagodne ogniskowe zwłóknienie skóry i ogniskową regenerację mięśni skórnych (rysunek 4). Nie zaobserwowano fragmentów implantu ani reakcji zapalnych. W próbkach pobranych z miejsca wszczepienia materiału modyfikowanego kwasem ferulowym w tkance podskórnej stwierdzono ogniska makrofagów, dość liczne wielojądrzaste komórki olbrzymie (typu ciała obcego), zmienną liczbę limfocytów oraz nacieki pojedynczych heterofili w tkance podskórnej z towarzyszącą proliferacją tkanki łącznej. Obserwacje te, widoczne wyraźnie w postaci ogniskowego zgrubienia skóry, wskazują na zaawansowaną resorpcję implantu. W próbkach pobranych z miejsca wszczepienia materiału modyfikowanego kwasem galusowym widoczna była ogniskowa proliferacja dobrze unaczynionej, bogatej w kolagen tkanki łącznej z hialinizacją w skórze. Badany naskórek był umiarkowanie akantotyczny. Nie zaobserwowano żadnych fragmentów implantów ani reakcji zapalnych. Można zatem stwierdzić, że kolagen modyfikowany kwasem kawowym i galusowym wchłania się szybciej i łatwiej niż modyfikowany kwasem ferulowym i nie wywołuje procesu zapalnego.

Materiały chitozanowe oraz kolagenowe z dodatkiem wybranych kwasów fenolowych po zaimplantowaniu w tkankę podskórną królików nie wywołały żadnych niepokojących stanów zapalnych, co świadczy o ich biokompatybilności. Na podstawie zdjęć histologicznych tkanek stwierdzono, że materiały na bazie chitozanu modyfikowanego kwasem galusowym

oraz kwasem taninowym uległy całkowitej resorpcji, z kolei materiał chitozanowy zawierający kwas ferulowy uległ częściowej resorpcji. Natomiast materiał kolagenowy modyfikowany kwasem kawowym i galusowym wchłoniął się szybciej i łatwiej niż modyfikowany kwasem ferulowym. Wszystkie proponowane materiały mogą znaleźć zastosowanie w inżynierii tkankowej ze względu na ich biokompatybilność, jednak organizacja tkanki w miejscu implantacji jest najkorzystniejsza, zarówno w przypadku materiału na bazie chitozanu jak i kolagenu, w przypadku materiału zawierającego kwas galusowy.

4.5. Podsumowanie

Problem badawczy, który stanowi podstawę osiągnięcia naukowego w ramach postępowania habilitacyjnego, dotyczył modyfikacji materiałów biopolimerowych w celu uzyskania doskonalszych właściwości mechanicznych i powierzchniowych, przy zachowaniu ich biokompatybilności. Moje badania koncentrowały się na poszukiwaniu bezpiecznych związków pochodzenia naturalnego, mogących pełnić rolę środków sieciujących dla biopolimerów. Zaproponowałam modyfikacje materiałów biopolimerowych, w formie filmów i scaffoldów, poprzez dodatek kwasów fenolowych, takich jak kwas taninowy, kwas ferulowy, kwas galusowy oraz kwas kawowy.

Do najważniejszych wyników badań własnych, wnoszących znaczący wkład w rozwój nauk chemicznych należy:

- Wykazanie, że zastosowane przeze mnie związki fenolowe mogą pełnić rolę środków sieciujących biopolimery, co stanowi nowy paradygmat w badaniach nad naturalnymi związkami sieciującymi. Sieciowanie odbywa się poprzez tworzenie wiązań wodorowych, między grupami hydroksylowymi obecnymi w związkach fenolowych a grupami aminowymi oraz hydroksylowymi występującymi w łańcuchu polimerowym;
- Wykazanie, że otrzymane przeze mnie materiały zawierające związki fenolowe cechowały się niższą chropowatością powierzchni filmów oraz lepszymi parametrami mechanicznymi, takimi jak wyższy moduł Younga i wartość maksymalnej wytrzymałości na rozciąganie (w przypadku filmów) oraz na ściskanie (w przypadku scaffoldów), w porównaniu z materiałami bez związków fenolowych. Dodatkowo, filmy chitozanowe z dodatkiem kwasu ferulowego oraz kwasu kawowego charakteryzowały się najniższą energią swobodną, przy jednoczesnej wysokiej hydrofilowości powierzchni, co pozytywnie wpływa na integralność biomateriałów z komórkami [H1-

H4, H6-H9];

- Opracowanie pionierskiej metody sieciowania układów biopolimer/związek fenolowy, z wykorzystaniem dodatkowych środków sieciujących, takich jak glikol polietylenowy [H4], glioksal [H8, H11] oraz bioszkło 45S5 [H9]. Zaproponowane przeze mnie podwójne sieciowanie stanowi innowacyjny sposób otrzymywania materiałów biopolimerowych, które sprostają współczesnym wyzwaniom, takim jak poprawa właściwości mechanicznych i stabilności, przy jednoczesnym wykazywaniu aktywności przeciwbakteryjnej, cytokompatybilności i braku właściwości hemolitycznych;
- Jako pierwsza dokonałam selekcji szczepów odpowiedzialnych za ich degradację materiałów na bazie chitozanu oraz kwasu taninowego, co umożliwia opracowanie preparatów przyspieszających rozkład materiałów chitozanowych modyfikowanych kwasem taninowym [H5];
- Wykazanie, że promieniowanie UVC może być skutecznym czynnikiem sterylizującym materiały chitozanowe modyfikowane kwasem taninowym, kwasem ferulowym oraz kwasem kawowym, co jest istotne z punktu widzenia medycznych zastosowań tych materiałów [H2];

Podsumowując, prowadzone przeze mnie badania to skokowy postęp w badaniach nad poszukiwaniem naturalnych środków sieciujących biopolimery. Uzyskane przeze mnie wyniki stanowią podstawy do projektowania materiałów funkcjonalnych do zastosowań medycznych. Prowadzone przeze mnie badania łączące aspekty chemii i biologii wnoszą istotny wkład w rozwój innowacji w dziedzinie chemii polimerów, przyczyniając się do dalszego postępu w naukach chemicznych. Zaprojektowane i otrzymane przeze mnie nowe materiały charakteryzowały się cytokompatybilnością [H1, H6, H8-H11], brakiem hemolitycznych właściwości [H7, H10, H11], aktywnością przeciwbakteryjną [H2-H4,H6,H10] oraz biokompatybilnością [H7,H10], są więc bezpieczne dla organizmu żywego i dlatego mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w medycynie.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Opis działalności naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

W trakcie studiów licencjackich zainteresowałam się badaniami nad biopolimerami. Kontynuowałam tę tematykę również w trakcie studiów magisterskich. Realizacja założeń pracy magisterskiej pt. „Antibiotic release from chitosan and collagen composites”, przygotowanej na anglojęzycznej specjalności Chemistry of Advanced Materials, pod kierunkiem prof. dr hab. Aliny Sionkowskiej, pozwoliła mi na lepsze zrozumienie zdobytej w trakcie studiów wiedzy, zwłaszcza z dziedziny chemii polimerów pod kątem ich zastosowania jako biomateriały. Głównymi składnikami badanych przeze mnie materiałów był kolagen oraz chitozan. Kolagen izolowany ze ścięgien szczurzych ogonów, modyfikowałam dodatkiem chitozanu. Otrzymane materiały wykorzystałam jako matryce do uwalniania antybiotyku, jakim była gentamycyna. Rezultaty badań były prezentowane na konferencjach oraz zostały opublikowane w formie 2 artykułów.

Zdobyte doświadczenie oraz wiedza przyczyniły się do zainteresowania tematyką biopolimerów podczas realizacji pracy doktorskiej (od 2013 roku) pt. „Kompozyty kolagenu, chitozanu oraz kwasu hialuronowego jako matryce dla nanocząstek nieorganicznych” pod kierunkiem prof. dr hab. Aliny Sionkowskiej, na Wydziale Chemii UMK. Badania w ramach pracy doktorskiej były częściowo realizowane na Wydziale Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, w ramach współpracy z dr hab. Anną Marią Osyczką, prof. UJ. Podczas stażu na Wydziale Biologii UJ, a także w ramach dalszej współpracy, zbadana została cytotoksyczność otrzymanych materiałów metodami *in vitro*. Ponadto, biogodność materiałów została zbadana metodami *in vivo* (na modelu zwierzęcym) na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, w ramach współpracy z prof. dr hab. Izabelą Polkowską. Będąc na studiach doktoranckich kierowałam projektem pt. „Projektowanie, otrzymywanie i badanie właściwości materiałów na bazie polimerów naturalnych z dodatkiem glikozaminoglikanów izolowanych z odpadów przemysłu spożywczego”(nr NCN 2015/19/N/ST8/02176), który uzyskał finansowanie w ramach konkursu Preludium Narodowego Centrum Nauki. Wyniki uzyskane w ramach projektu zostały opublikowane w formie 5 artykułów. Kierowanie projektem NCN (w latach 2016-2019), a także trzema grantami Wydziału Chemii UMK dotacji statutowej dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich (w latach 2015,2016,2018) nauczyło mnie samodzielności

naukowej.

Przed uzyskaniem stopnia doktora byłam współautorką 31 publikacji w czasopismach wyróżnionych w Journal Citation Reports, 9 publikacji w czasopismach wymienionych w wykazie MNiSW oraz 1 recenzowanej publikacji niepunktowanej. Sumaryczny współczynnik IF wynosił 89,751, a liczba punktów MNiSW=1082 (zgodnie z rokiem publikacji). Wyniki badań były prezentowane w formie komunikatów (17 prezentacji) oraz posterów (22 prezentacji). Niektóre prezentacje konferencyjne zostały nagrodzone:

- I nagroda za najlepsze wystąpienie w sesji biomateriałowej podczas II Ogólnopolskiego Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów (02.12.2017, Poznań)
- I nagroda za najlepszą prezentację ustną wygłoszoną podczas III Łódzkiego Sympozjum Doktorantów Chemii (28.04.2015, Łódź)
- III miejsce w konkursie na najlepszy poster naukowy zaprezentowany na IX Kopernikańskim Seminarium Doktoranckim (24-26.06.2015, Toruń).

Podczas studiów doktoranckich otrzymałam stypendium w ramach projektu *Krok w przyszłość – stypendia dla doktorantów* (realizowanego w ramach Poddziałania 8.2.2 Regionalne strategie innowacji Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki 2007-2013 oraz współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, budżetu państwa oraz budżetu województwa (w 2015 roku).

Praca naukowo-badawcza została doceniona przez Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu nagrodą III stopnia za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowo-badawczej w 2014 roku, II stopnia za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowo-badawczej w 2017 oraz 2018 roku, oraz wyróżnieniem zespołowym za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowo-badawczej w roku 2016. W 2012 roku otrzymałam prestiżowe wyróżnienie - stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wybitne osiągnięcia na rok akademicki 2013/2014. Ponadto uzyskałam tytuł Najlepszego Studenta na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu w roku akademickim 2011/12 oraz tytuł Najlepszego Absolwenta Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w roku akademickim 2012/13.

1 kwietnia 2018 roku zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze Chemii Biomateriałów i Kosmetyków. Rozprawę doktorską pt. „Kompozyty kolagenu, chitozanu oraz kwasu hialuronowego jako matryce dla nanocząstek nieorganicznych” obroniłam 19 kwietnia 2019 roku.

Opis działalności naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

Od 2019 roku pracuję w Katedrze Chemii Biomateriałów i Kosmetyków na stanowisku adiunkta. Udział w licznych konferencjach międzynarodowych oraz krajowych, jak i odbyte staże, pozwoliły mi nawiązać współpracę naukową z wieloma ośrodkami. Publikacja prac w tematyce modyfikacji materiałów biopolimerowych zaowocowała otrzymaniem zaproszeń do wygłoszenia wykładów. Trzy wykłady wygłosiłam na konferencjach międzynarodowych: International Conference on NANO IN ENGINEERING, SCIENCE AND TECHNOLOGY (i-NEST), Conference of The Biotech Research Society, International Women's Day Workshop. Wygłosiłam także wykład na zaproszenie dla Koła Naukowego 'Materiały w Medycynie' Politechniki Gdańskiej oraz wykład na zaproszenie dla Sekcja Biokosmetologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Po uzyskaniu stopnia doktora ukazały się 43 publikacje w czasopismach posiadających współczynnik Impact Factor, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports, których jestem współautorką. W 30 pierwszym autorem, a w 28 jestem autorem korespondencyjnym. Ponadto jestem autorką lub współautorką 3 rozdziałów w monografii, 1 patentu oraz 2 zgłoszeń patentowych. Część prac badawczych realizowana była przy współpracy z innymi ośrodkami, w tym również zagranicznymi:

- Department of Dermatology, University of Münster, Niemcy;
- Centre for Biomaterials Cellular and Molecular Theranostics, Vellore Institute of Technology, Vellore, Tamil Nadu, India;
- Department of Mechanical Engineering, Amrita Vishwa Vidyapeetham, Amritapuri Campus, Clappana, India;
- Department of Materials Engineering, Indian Institute of Science, Bangalore, India;
- UT Health Science Center, Department of Cellular and Structural Biology, San Antonio, USA;
- Department of Dermatology, Comprehensive Cancer Center, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, USA;
- Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydział Biologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie;
- Instytut Technologii Maszyn i Materiałów, Wydział Inżynierii Mechanicznej i Okrętownictwa, Politechnika Gdańska;
- Klinika Chirurgii Onkologicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny;
- Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie;

- Katedra Anatomii Patologicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie;
- Wydział Inżynierii Lądowej i Geodezji, Wojskowa Akademia Techniczna, Warszawa;
- Katedra Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii, Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu;
- Katedra Chemii Fizycznej i Fizykochemii Polimerów, Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Po uzyskaniu tytułu doktora odbyłam dwa trzymiesięczne staże: w Vellore Institute of Technology (Vellore, Indie) oraz CURAM (Galway, Irlandia):

- Vellore Institute of Technology, Vellore, India (opiekun: Prof. Geetha Manivasagam)

Staż naukowy odbyłam w dniach 01.07-01.10.2019, podczas którego prowadziłam badania naukowe dotyczące otrzymania materiałów biopolimerów oraz ich charakterystyki do zastosowań medycznych. Wynikiem odbytego stażu są 4 artykuły opublikowane w czasopiśmie międzynarodowych (H9, P.7., P.9., P.29). Ponadto we współpracy z Vellore Institute of Technology złożone zostały dwa projekty w ramach konkursu INDIA- POLAND JOINT RESEARCH PROGRAMME NAWA 2019 pt. „Studies on in vitro and in vivo effects of Rubia Tinctorum and Macrotyloma uniflorum extracts on urinary crystals” oraz „3D bioprinted human epidermal skin substitute for permeation and toxicity evaluation of cosmetics containing nanoparticles”. W ramach współpracy złożony został także projekt w ramach konkursu M.Era-Net 2023 pt. „Multifunctional hybrid hydrogel films to prevent microbial diseases: nanostructure and biodegradability aspect”, gdzie wyszczególniona byłam jako koordynator konsorcjum (pozostali partnerzy projektu: University of Castilla-La Mancha (UCLM) – Hiszpania, University Estadual Paulista (UNESP) – Brazylia, National Institute of Research and Development for Optoelectronics (INOE) – Rumunia, Vellore Institute of Technology (VIT) – Indie, Samos Medical Enterprise (SAMOSE) – Hiszpania).

- CURAM, Galway, Ireland (Prof. Abhay Pandit)

Staż naukowy odbyłam w dniach 01.09-01.12.2023, podczas którego prowadziłam badania naukowe dotyczące otrzymania i weryfikacji właściwości materiałów na bazie biopolimerów z dodatkiem kwasu taninowego modyfikowanego plazmą. W ramach współpracy powstała publikacja pt. „Cold plasma treatment of tannic acid as a green technology for the fabrication of advanced cross-linkers for bioactive collagen/gelatin hydrogels” opublikowana w czasopiśmie International Journal of Biological Macromolecules (P.32), a także złożony został

projekt pt. „Obróbka zimną plazmą jako ekologiczna technologia wytwarzania zaawansowanych środków sieciujących” w konkursie FIRST TEAM (Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej) w sierpniu 2023, oraz projekt w konkursie SONATA 19 (Narodowe Centrum Badań i Rozwoju) pt. „Wykorzystanie zimnej plazmy do modyfikacji kwasu taninowego prowadzące do otrzymania zaawansowanych środków sieciujących” w grudniu 2023.

Od 2019 roku kierowałam projektem pt. „Liofilizat glikozaminoglikanów i kolagenu z rybich skór do zastosowań biomedycznych”, który uzyskał finansowanie w ramach konkursu TANGO V, organizowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju. Projekt realizowany był przez zespół składający się z 4 osób (bez kierownika). Najważniejszymi rezultatami projektu jest zgłoszenie patentowe (PP3), uzyskanie złotego medalu na międzynarodowych targach E-NNOVATE 2023 (Bydgoszcz, Polska) oraz EUROINVENT 2023 (Iasi, Rumunia) za wynalazek „Lyophilisate of collagen and glycosaminoglycans isolated from fish skin”. Ponadto, kierowałam 2 projektami, które uzyskały finansowanie w ramach programu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza”. Dodatkowo kierowałam projektem pt. „Opracowanie kosmetyku przeznaczonego do pielęgnacji skóry osób po usunięciu zmian nowotworowych” w ramach KONKURSU NA GRANT dla pracowników naukowych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu „Inkubator Innowacyjności UMK_4.0”, którego rezultatem jest zgłoszenie patentowe (PP2), a także wprowadzenie na rynek kremu onkologicznego, dostępnego w sprzedaży od czerwca 2023 roku. Działalność naukowo-badawcza została doceniona przez Ministra Edukacji i Nauki poprzez przyznanie mi stypendium dla wybitnych młodych naukowców w 2022 roku, a także przez władze rektorskie uczelni oraz władze dziekańskie licznymi stypendiami, takimi jak nagrody zespołowe II stopnia za osiągnięcia w 2019 oraz 2021 roku, I stopnia za osiągnięcia w 2020 roku, oraz wyróżnienie indywidualne za osiągnięcia w 2020 roku. Ponadto aktywność publikacyjna została uhonorowana przyznaniem Stypendiów Rektora UMK (łącznie 9) za wysoko punktowane publikacje naukowe w czasopismach z przypisaną liczbą punktów od 140 do 200 w wykazie MNiSW.

Poza działalnością publikacyjną, wyniki badań naukowych prezentowane były przeze mnie również na wielu międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych, w postaci komunikatów naukowych (7) oraz posterów (6). Jestem także współautorką komunikatów ustnych (2) oraz plakatów (13).

Jestem członkiem Polskiego Stowarzyszenia Biomateriałów, a także European Society for Biomaterials (ESB).

Po uzyskaniu stopnia doktora recenzowałam ponad 80 publikacji w wielu czasopismach naukowych: Materials Science & Engineering R (Elsevier, IF=31); Acta Biomaterialia (Elsevier, IF=9,7); ACS Biomaterials Science & Engineering (ACS, IF=5,8); Sustainable Chemistry and Pharmacy (Elsevier, IF=6); Scientific Reports (Nature, IF=4,6); Asian Journal of Pharmaceutical Sciences (Elsevier, IF=10,2); Carbohydrate Polymers (Elsevier, IF=11,2); International Journal of Biological Macromolecules (Elsevier, IF=8,2); LWT - Food Science & Technology (Elsevier, IF=6); Colloids and Interface Sciences Communications (Elsevier, IF=4,5); Food Bioscience (Elsevier, IF=5,2); Surfaces and Interfaces (Elsevier, IF=6,2); Current Neuropharmacology (Bentham, IF=5,3); Food Chemistry (Elsevier, 8,8); Journal of Drug Delivery Science and Technology (Elsevier, IF=5); Polymers for Advanced Technologies (Wiley, IF=3,4); Materials Letters (Elsevier, IF=3); Polymer (Elsevier, IF=4,6); Polymer Degradation and Stability (Elsevier, IF=5,9); Polymer Testing (Elsevier, IF=5,1); New Journal of Chemistry (RSC Publishing, IF=3,3); Materials Today Communications (Elsevier, IF=3,8); Toxicology in Vitro (Elsevier, IF=3,2); Molecules (MDPI, IF=4,6); Materials (MDPI, IF=3,4); Marine Drugs (MDPI, IF=5,4); International Journal of Molecular Sciences (MDPI, IF=5,6); Polymers (MDPI, IF=5); Cosmetics (MDPI, IF=3,3); Pharmaceuticals (MDPI, IF=4,6); Nanomaterials (MDPI, IF=5,3); Pathogens (MDPI, IF=3,7); Antioxidants (MDPI, IF=7); Coatings (MDPI, IF=3,4); Journal of Polymer Engineering (De Gruyter, IF=2); Applied Radiation and Isotopes (Elsevier, IF=1,6); Current Cosmetic Sciences (Bentham, IF=0). Jestem także redaktorem wydania specjalnego pt. "Biodegradable Polymers to Biomedical and Packaging Applications" w czasopiśmie Polymers, MDPI [IF=5; MNiSW=100], oraz redaktorem wydania specjalnego "Biocompatible Membrane Materials" w czasopiśmie Membranes, MDPI [IF=4,2; MNiSW=140]. Jestem także członkiem Editorial Board Member czasopisma Current Cosmetic Science (Bentham Science).

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę

Działalność dydaktyczna

Moja działalność dydaktyczna związana jest z chemią kosmetyczną. Podniosłam swoje kompetencje kończąc studia podyplomowe „Chemia i Technologia Kosmetyków” w Wyższej Szkole Zawodowej Kosmetyki i Pielęgnacji Zdrowia w Warszawie. Prowadzę autorskie

wykłady ze studentami Wydziału Chemii UMK z przedmiotów: *Podstawy produkcji kosmetyków* (15h), *Kosmetyki kolorowe* (15h), *Preparaty pielęgnacyjne* (5h), *Technologia kosmetyków* (3h) oraz anglojęzyczny przedmiot *Cosmetics chemistry* (30h). Ponadto prowadzę 10 h wykładu ogólnouniwersyteckiego: *Nowoczesne trendy w branży kosmetycznej*. Prowadzę także autorskie ćwiczenia z *Kosmetyków pielęgnacyjnych* (15h), *Preparatów pielęgnacyjnych* (10h), *Podstaw produkcji kosmetyków* (15h), *Technologii kosmetyków* (30h), jak i zajęcia laboratoryjne z *Kosmetyków kolorowych* (30h), *Form kosmetycznych* (10h), *Technologii kosmetyków* (10h), *Materiałów opakowaniowych* (30h), *Preparatów pielęgnacyjnych* (5h). Jestem koordynatorem kilku przedmiotów (*Podstawy produkcji kosmetyków*, *Kosmetyki kolorowe*, *Nowoczesne trendy w branży kosmetycznej*). Prowadzę również autorskie ćwiczenia i warsztaty badawcze w zakresie projektu Universitas Copernicana Thoruniensis In Futuro II – modernizacja Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w ramach Zintegrowanego Programu Uczelni. Obecnie pełnię funkcję promotorki pomocniczej doktorantki ze Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Academia Scientiarum Thoruniensis w roku akademickim 2023/2024. Recenzowałam jedną pracę doktorską pt. "Synthesis Characterization and Controlled Drug Delivery Application of Gelatin based Biodegradable Hydrogels" autorstwa Pani Tanwar Archana Gajendra (Savitribai Phule Pune University). Do tej pory wypromowałam 11 magistrów i 17 licencjatów. Byłam również recenzentem 5 prac magisterskich i 21 prac licencjackich. Ponadto pełniłam funkcję mentora w ramach programu Wydziału Chemii UMK Studia z mentorem i objęłam opieką mentorską 5 studentów kierunku Chemia kosmetyczna. Wsparcie mentorskie zaowocowało ich licznymi sukcesami, wśród których można wyróżnić 7 Stypendiów Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wybitne osiągnięcia. Zachęcam studentów do udziału w konferencjach zagranicznych i krajowych. Wspieram ich również w pisaniu pierwszych projektów naukowych. Mam przyjemność pełnić funkcję opiekuna merytorycznego 4 grantów studenckich realizowanych w ramach konkursu Inicjatywa Doskonałości – Grants4NCUstudents. W latach 2020/2021 oraz 2021/2022 byłam opiekunem studentów I roku kierunku chemia kosmetyczna. Współpracuję także ze studentami z jednostek zagranicznych. Pełniłam funkcję promotora naukowego studentki Berfu Yigrık (Ege University, Izmir, Turkey), która odbyła 4-tygodniowy staż na Wydziale Chemii UMK w 2022 roku (03-30.07) w ramach programu TSSP NatSci 2022.

Działalność organizacyjna

Poza działalnością naukową i dydaktyczną rozwijam umiejętności organizacyjne. Współorganizowałam szkołę letnią TSSP NatSci 2023 jako sekretarz, podczas której 15

studnetów z zagranicy odwiedzało Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu w celu realizacji miesięcznych staży naukowych. Od 2021 jestem członkiem wydziałowego zespołu ds. promocji i angażowałam się w Dni Otwarte Wydziału Chemii UMK w latach 2020-2023. Aktywność organizacyjna została nagrodzona zespołowym wyróżnieniem Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia organizacyjne w 2021 roku, a także Nagrodą Pani Dziekan Wydziału Chemii (2023).

Działalność popularyzująca naukę

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk chemicznych rozwinęłam działalność upowszechniającą i popularyzującą naukę. Uczestniczyłam w Toruńskim Festiwalu Nauki i Sztuki (2022 rok) promując naukę wśród dzieci i dorosłych. Prowadziłam zajęcia w ramach Uniwersytetu Młodych organizowane przez Fundację Amicus Universitatis Nicolai Copernici, oferujące młodzieży poszerzenie swojej wiedzy z chemii. W ramach projektu prowadzę zajęcia laboratoryjne z uczniami szkół podstawowych lub średnich. Ponadto prowadzę wykłady popularnonaukowe dla uczniów szkół podstawowych oraz ponadpodstawowych, którzy odwiedzają Wydział Chemii UMK.

Do działań popularyzujących naukę należy również współpraca z firmą kosmetyczną DLA i wspólne nagranie filmów edukacyjnych udostępnionych na stronach internetowych firmy oraz Wydziału Chemii UMK.

7. Plany badawcze

Moje plany badawcze dotyczą przede wszystkim aspektów komercjalizacji wyników badań. Prowadzę badania nad specjalistycznymi produktami kosmetycznymi z dodatkiem kwasów fenolowych. Badania te są podstawą projektu LIDER XV, który złożę w czerwcu 2024 roku. Moje plany badawcze wiążę także z chęcią opracowania innowacyjnych metod modyfikacji związków fenolowych dla polepszenia ich efektywności w wykorzystaniu ich jako środki sieciujące, prowadzące do ich kontrolowanego uwalniania. Metody, które chcę do tego celu zastosować, są przyjazne dla środowiska i nie przyczyniają się do produkcji niebezpiecznych odpadów.

8. Literatura

- [1] H.-Y. Cheung, K.-T. Lau, T.-P. Lu, D. Hui, A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development, *Compos B Eng* 38 (2007) 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2006.06.014>.
- [2] M.I. Sabir, X. Xu, L. Li, A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications, *J Mater Sci* 44 (2009) 5713–5724. <https://doi.org/10.1007/s10853-009-3770-7>.
- [3] S. Chahal, A. Kumar, F.S.J. Hussian, Development of biomimetic electrospun polymeric biomaterials for bone tissue engineering. A review, *J Biomater Sci Polym Ed* 30 (2019) 1308–1355. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1630699>.
- [4] A. Kyzioł, W. Khan, V. Sebastian, K. Kyzioł, Tackling microbial infections and increasing resistance involving formulations based on antimicrobial polymers, *Chemical Engineering Journal* 385 (2020) 123888. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123888>.
- [5] B. Kaczmarek, A. Sionkowska, J. Kozłowska, A.M. Osyczka, New composite materials prepared by calcium phosphate precipitation in chitosan/collagen/hyaluronic acid sponge cross-linked by EDC/NHS, *Int J Biol Macromol* 107 (2018) 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.173>.
- [6] M. Michalska-Sionkowska, O. Warzyńska, B. Kaczmarek-Szczepańska, K. Łukowicz, A.M. Osyczka, M. Walczak, Preparation and Characterization of Fish Skin Collagen Material Modified with β -Glucan as Potential Wound Dressing, *Materials* 14 (2021) 1322. <https://doi.org/10.3390/ma14061322>.
- [7] P. Sapała, K. Bialik-Wąs, K. Malarz, Are Natural Compounds a Promising Alternative to Synthetic Cross-Linking Agents in the Preparation of Hydrogels?, *Pharmaceutics* 15 (2023) 253. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010253>.
- [8] N. Kumar, N. Goel, Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications, *Biotechnology Reports* 24 (2019) e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>.
- [9] J. Yeo, J. Lee, S. Yoon, W.J. Kim, Tannic acid-based nanogel as an efficient anti-inflammatory agent, *Biomater Sci* 8 (2020) 1148–1159. <https://doi.org/10.1039/C9BM01384A>.
- [10] B. Kaczmarek, Tannic Acid with Antiviral and Antibacterial Activity as A Promising Component of Biomaterials—A Minireview, *Materials* 13 (2020) 3224. <https://doi.org/10.3390/ma13143224>.
- [11] M. Wang, T. Tang, Surface treatment strategies to combat implant-related infection from the beginning, *J Orthop Translat* 17 (2019) 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2018.09.001>.
- [12] V.M. Villapun Puzas, L.N. Carter, C. Schröder, P.E. Colavita, D.A. Hoey, M.A. Webber, O. Addison, D.E.T. Shepherd, M.M. Attallah, L.M. Grover, S.C. Cox, Surface Free Energy Dominates the Biological Interactions of Postprocessed Additively Manufactured Ti-6Al-4V, *ACS Biomater Sci Eng* 8 (2022) 4311–4326. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.2c00298>.
- [13] Y. Zuo, X. Long, Y. Zheng, J. Zhang, L. Wang, J. Hu, F. Jiao, Gelatin-tannic acid coating for high flux oil-water separation, *J Environ Chem Eng* 10 (2022) 107992. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107992>.
- [14] M07: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 11th Edition, (n.d.), n.d.
- [15] G. Sathishkumar, K. Gopinath, K. Zhang, E.-T. Kang, L. Xu, Y. Yu, Recent progress in tannic acid-driven antibacterial/antifouling surface coating strategies, *J Mater Chem B* 10 (2022) 2296–2315. <https://doi.org/10.1039/D1TB02073K>.
- [16] A. Verlee, S. Mincke, C. V. Stevens, Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives, *Carbohydr Polym* 164 (2017) 268–283. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001>.
- [17] D. MubarakAli, F. LewisOscar, V. Gopinath, N.S. Alharbi, S.A. Alharbi, N. Thajuddin, An inhibitory action of chitosan nanoparticles against pathogenic bacteria and fungi and their potential applications as biocompatible antioxidants, *Microb Pathog* 114 (2018) 323–327. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.043>.
- [18] D.-T. Vo, C.-K. Lee, Antimicrobial sponge prepared by hydrophobically modified chitosan for

- bacteria removal, Carbohydr Polym 187 (2018) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.082>.
- [19] R.C. Goy, D. de Britto, O.B.G. Assis, A review of the antimicrobial activity of chitosan, Polímeros 19 (2009) 241–247. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>.
- [20] R. Greenhalgh, N.C. Dempsey-Hibbert, K.A. Whitehead, Antimicrobial strategies to reduce polymer biomaterial infections and their economic implications and considerations, Int Biodeterior Biodegradation 136 (2019) 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.10.005>.
- [21] J.-W. Rhim, S.-I. Hong, H.-M. Park, P.K.W. Ng, Preparation and Characterization of Chitosan-Based Nanocomposite Films with Antimicrobial Activity, J Agric Food Chem 54 (2006) 5814–5822. <https://doi.org/10.1021/jf060658h>.
- [22] C. QIN, H. LI, Q. XIAO, Y. LIU, J. ZHU, Y. DU, Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity, Carbohydr Polym 63 (2006) 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.09.023>.
- [23] E.I. Rabea, M.E.-T. Badawy, C. V. Stevens, G. Smagghe, W. Steurbaut, Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action, Biomacromolecules 4 (2003) 1457–1465. <https://doi.org/10.1021/bm034130m>.
- [24] G.S. El-Feky, S.S. Sharaf, A. El Shafei, A.A. Hegazy, Using chitosan nanoparticles as drug carriers for the development of a silver sulfadiazine wound dressing, Carbohydr Polym 158 (2017) 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.054>.
- [25] S. Henkelman, G. Rakhorst, J. Blanton, W. van Oeveren, Standardization of incubation conditions for hemolysis testing of biomaterials, Materials Science and Engineering: C 29 (2009) 1650–1654. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.01.002>.

9. Parametry naukometryczne całego dorobku publikacyjnego

Sumaryczny Impact Factor*	274,693
Sumaryczny Impact Factor**	347,3
Całkowita liczba cytowań, z wyłączeniem autocytowań***	1492
Indeks Hirscha***	22
Suma punktów MNiSW*	5657
Suma punktów MNiSW**	7370

* Zgodnie z rokiem publikacji

** Zgodnie z obecną wartością

*** zgodnie z bazą Web of Science Core Collection (12.05.2024)

Krzysztof Szczępała