

Oponentní posudek disertační práce: **Hydrogelové nosiče pro tkáňové inženýrství**

Autor disertační práce: **Ing. Petra Chocholatá**

Oponent disertační práce: **Ing. Tomáš Kovářík, Ph.D.**

Disertační práce Ing. Petry Chocholaté „Hydrogelové nosiče pro tkáňové inženýrství“ se zabývá aktuální problematikou studia nových biopolymerních nanokompozitů s motivací syntetizovat a charakterizovat perspektivní materiál pro léčbu kostních defektů.

Práce je zaměřena na přípravu a studium nanokompozitního systému na bázi polyvinylalkoholu, kyseliny hyaluronové a anorganického plniva ve formě hydroxyapatitu (HAp). Vyztužení polymerní matrice o složku HAp je provedeno dvěma způsoby *in situ* syntézou a fyzikální inkorporací v průběhu míchání.

V úvodní části je srozumitelně představena problematika kostního tkáňového inženýrství včetně parametrizace buněčného testování, metod hodnocení a způsobů kvantifikace. Teoretická část se dále zaměřuje na popis kostní tkáně, její vývoj, složky, organizaci, struktury a vlastnosti. V textu jsou výstižně shrnuty materiály využívány k léčbě kostních defektů včetně popisu vlastností, možností přípravy a schopnosti interakce v biologickém prostředí. Velmi kladně hodnotím zejména souhrnné tabulky např. *Tab. 4. – Aktivita kostních štěpů podle jejich typu* a *Tab. 6. – Výhody a nevýhody materiálů používaných v tkáňovém inženýrství*.

Poslední část teoretické práce je věnována úvodu do problematiky hydrogelů. V rešerši jsou vhodně uvedeny způsoby síťování hydrogelů a z toho plynoucí vlastnosti připravených materiálů. Kladně hodnotím zejména odstavec *1.5 – Současnost a budoucnost kostního tkáňového inženýrství*, kde jsou věcně shrnuty vědecké výzvy v biologické i materiálové oblasti.

Praktická část práce logicky navazuje stanovením hlavních a dílčích cílů práce. Tuto strukturu považuji za vhodně zvolenou, avšak postrádám detailnější popis motivace experimentálního programu. Z hlediska podrobné rešeršní části mi chybí vysvětlení např. co si slíbují od navrženého experimentu, na základě jakých kritérií jsou zvoleny poměry složek, proč byla k přípravě HAp zvolena technika sol-gel a jakou výhodu přináší takto připravený fosforečnan-vápenatý.

Kladně hodnotím strukturu experimentální části, která je prakticky rozdělena do 5 dílčích částí tj. cílů, které se zabývají parametrizací přípravy a popisem fyzikálních a biologických vlastností hydrogelových kompozitů.

Diskuze výsledků u **dílčích cílů 1 a 2** přináší zajímavé závěry. U hydrogelových kompozitů je stanoveno optimum poměru složek a počet cyklů síťování s ohledem na dosaženou hustotu a porositu. Výsledky **dílčího cíle 2** se věnují již analýze experimentálních vzorků modifikovaných 5% suspenzí HAp. I zde je nalezeno optimum poměru složek HA/HAp 1:2 s ohledem na interpretaci výsledků stupně zbobtnání, hemokompatibility a viability buněk MG-63.

Diskuze výsledků u **dílčího cíle 3** přináší zajímavá data viskoelastických vlastností hydrogelových kompozitů s poměrem složek HA/HAp 1:2 a s různým způsobem inkorporace HAp. Zde se ukazuje, že forma HAp připravených *in situ* má vliv na vývoj elastických vlastností kompozitů a výrazně zvyšuje modul pružnosti u vzorku IHA2 při zatěžování tlakovou silou.

Za slabinu této části považuji řadu nejasností, které spatřuji v charakterizaci použitých sloučenin a materiálů.

Autorka se odkazuje na syntézu HAp [Kumar et al. 2009], avšak citace v disertační práci není uvedena správně. V seznamu použité literatury je uvedena práce [Kumar et al. 2017], která syntézu HAp skrze sol-gel techniku nepopisuje. Jde o review článků o využití PVA-hydrogelů v regenerativní medicíně. Jde pravděpodobně o drobnou chybu související se záměnou citace prací od stejného autora. Syntéza HAp v disertační práci je již realizována dle práce [Kumar et al. 2009] a končí vysušením suspenze při teplotě 70°C/1h.

Je tedy zřejmé, že HAp prášek je inkorporován ve výchozím stavu bez kalcinace (str. 44). Tento krok není nijak vysvětlen, přestože [Kumar et al. 2009] práškový materiál kalcinuje na 900°C/3h a dále sintruje při 1250°C.

Z literatury je známo že sol-gel techniky nabízí výhodu míchání reaktantů na molekulární úrovni, což zlepšuje chemickou homogenitu výsledného prášku. Samotný proces zahrnuje přípravu 3D anorganické sítě smícháním vhodných prekurzorů, po níž následuje stárnutí při pokojové teplotě, gelace, sušení a nakonec odstranění organických zbytků pomocí tepelného zpracování (kalcinace). Nedostatečné stárnutí a/nebo proces kalcinace mohou zapříčinit přítomnost řady nežádoucích sloučenin, které nemají povahu HAp. Jde převážně o CaO, Ca₂P₂O₇, Ca₃(PO₄)₂ a CaCO₃.

Z textu není příliš jasné zda HAp částice byly skutečně kalcinovány, přestože v diskuzi je uvedeno, že pro analýzu HAp ve skafoldech byly materiály upraveny kalcinací při teplotě 500°C (str. 46, str. 72). Výsledky IČ měření, tj. charakteristická IČ spektra, nejsou prakticky vůbec konfrontována s literaturou zabývající se sol-gel syntézou, s výjimkou práce [Šupová, 2020], která je ovšem zaměřena na studium biomineralizace a přípravu bioapatitů. Pro skutečné prokázání HAp fáze, by se zde nabízelo spíše využití difrakčních technik.

Z diskuze výsledků je patrné že způsob inkorporace HAp prášku do hydrogelové matrice výrazně ovlivňuje výsledné fyzikální a biologické vlastnosti kompozitů. Zde postrádám analýzu nebo komentář, který by popsal distribuci velikosti částic, morfologii částic příp. jejich stabilitu a stupeň dispergace v hydrogelové matrici. Tento fakt se následně projevuje např. v závěrech **dílčího cíle 3**, kde autorka vylučuje chemickou interakci HAp-organická matrice a definuje u částic HAp *in situ* lepší distribuci v polymerní matrici. Ani jeden z těchto závěrů nebyl analyticky potvrzen/vyvrácen nebo citován literaturou (str. 88).

Závěrečná část experimentální práce (**dílčí cíle 4 a 5**) je zaměřena na ověření adheze a proliferace buněk BM-hMSC na hydrogelech s vyšším množstvím HAp. V této části práce je důraz správně orientován do studia hydrogelů skrze řadu biologických interakcí a vizualizaci testovaných kompozitů IHA2 a IHB2.

Za hlavní přednosti této práce považuji systematickou a dobře strukturovanou teoretickou část. Ing. Chocholatá prokázala schopnost práce s odbornou literaturou a tvorbu uceleného vědeckého textu. Velkou přednost též spatřuji v komplexnosti pojetí studia hydrogelových kompozitů a nalezení řady chemicko-fyzikálně-biologických souvislostí posouvající stav poznání v oblasti implantačních materiálů.

I přes výše uvedené nejasnosti (doporučuji diskutovat v rámci obhajoby), předložená disertační práce naplňuje kritéria tvůrčí vědecké práce.

Disertační práce splňuje sledované cíle a **doporučuji** ji k obhajobě.

Otázky:

1. HAp byl v experimentu připraven ve formě prášku a později inkorporován ve formě 5% suspenze (str. 44).

Jaká je distribuce velikosti syntetizovaných částic?

Jaké analytické techniky byste využila ke stanovení velikosti distribuce částic?

2. Obrazová analýza FWHM spektra popisuje krystalinitu připravených HAp (str. 65).

Lze pomocí této techniky kvantifikovat stupeň krystalinity?

Jakou další analytickou techniku byste aplikovala pro kvalitativní a kvantitativní popis fází?

3. Jak si vysvětlujete relativně nízké hodnoty E, dosažených u všech vzorků: 1,29 - 2,93 kPa (str. 62)?

Ing. Tomáš Kovářik, Ph.D.

Západočeská univerzita v Plzni
Nové technologie - výzkumné centrum
Chemické procesy a biomateriály

V Plzni, 3. dubna 2023