



Gdańsk, 03.01.2022

dr hab. inż. Donata Konopacka-Łyskawa
Katedra Inżynierii Procesowej i Technologii Chemicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska
ul. Narutowicza 11/12
80-233 Gdańsk

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Aleksandry Kuźmińskiej pt. „Otrzymywanie i modyfikacja powierzchni poliuretanowych cylindrycznych rusztowań tkankowych”
wykonanej na Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej,
której promotorem jest prof. dr hab. inż. Tomasz Ciach,
a promotorem pomocniczym dr inż. Beata Butruk-Raszeja

Sylwetka Doktorantki

Pani mgr inż. Aleksandra Kuźmińska jest absolwentką studiów II stopnia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej specjalności Applied Biotechnology. W 2015 roku uzyskała tytuł magistra inżyniera, a temat jej pracy dyplomowej brzmiał „Bioactive surfaces promoting endothelial cells adhesion”. Od 2015 roku jest Doktorantką na Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej. W latach 2017-2019 była kierownikiem projektu badawczego NCN Preludium „Wpływ parametrów procesowych na wielkość porów powierzchniowych poliuretanowych struktur cylindrycznych o małych średnicach”. Pracowała na stanowisku badacza w następujących projektach: „Surface modification of polyurethane vascular grafts” (Współpraca Polsko-Tajwańska w latach 2015-2018) i „BioGraft – biomimetyczne protezy naczyniowe małych średnic” (NCN Lider, 2018-2021). Od maja 2020 do sierpnia 2021 roku Pani mgr inż. Aleksandra Kuźmińska była zatrudniona jako specjalista w Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii. Nie ubiegała się wcześniej o nadanie stopnia doktora.

Charakterystyka pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Aleksandry Kuźmińskiej pt. „Otrzymywanie i modyfikacja powierzchni poliuretanowych cylindrycznych rusztowań tkankowych” dotyczy preparatyki polimerowych struktur, które mogą być wykorzystywane jako rusztowania tkankowe i wpisuje się w nurt badań nad poszukiwaniem nowych materiałów do zastosowań biomedycznych. Została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Tomasza Ciacha, a promotorem pomocniczym jest dr inż. Beata Butruk-Raszeja.

Badania, które są podstawą ocenianej rozprawy doktorskiej zostały wykonane w ramach projektów:

- 1) „Surface modification of polyurethane vascular graft” – Grant Polsko-Tajwański, NCBI, PL-TWII/II/2015
- 2) “Wpływ parametrów procesowych na wielkość porów powierzchniowych poliuretanowych struktur cylindrycznych o małych średnicach” – Preludium, NCN, 2016/21/N/ST08/01953
- 3) „BioGraft – biomimetyczne protezy naczyniowe małych średnic” – Lider, LIDER/18/0104/L-8/16/NCBR/2017

Podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia doktora jest spójny tematycznie cykl artykułów, opublikowanych w czasopismach naukowych (m. in. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, *BioTechniques*, *Surface Innovations*, *Coatings*). Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje 194 strony. Wprowadzenie do cyklu artykułów jest napisane w języku polskim, natomiast siedem publikacji, stanowiących cykl artykułów naukowych będących podstawą rozprawy jest w języku angielskim. W trzech wskazanych publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem oraz autorem do korespondencji. Łączny współczynnik oddziaływania dla ocenianych publikacji wynosi $IF=24,259$. Wszystkie publikacje są wieloautorskie, przy czym liczba autorów w ocenianych publikacjach jest w zakresie od dwóch do pięciu. Załączone oświadczenia współautorów wskazują, że Doktorantka miała znaczący udział w opracowaniu metodyki badań, wykonaniu doświadczeń oraz opracowaniu i analizie wyników w większości artykułów. Miała też duży wkład w przygotowanie zarówno wstępnej jak i ostatecznej wersji tych publikacji.

Oprócz cyklu artykułów (str. 77-194), oceniana rozprawa doktorska zawiera spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (str. 9), spis pozostałych publikacji powstałych podczas działalności naukowej Doktorantki oraz patent (str. 10-11), zestawienie wystąpień konferencyjnych (str. 12-14), streszczenie w języku polskim (str. 15-16) i angielskim (str. 17-18), wykaz stosowanych w pracy symboli i skrótów (str. 19-20), wprowadzenie, w którym przedstawiono cel i zakres pracy, syntetyczną część literaturową związaną z tematyką rozprawy doktorskiej, zwięzłe przedstawienie otrzymanych wyników i wniosków (str. 23-60), bibliografię (str. 61-64) oraz oświadczenia współautorów publikacji (str. 65-76).

Omówienie rozprawy doktorskiej

Badania stanowiące postawę rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Aleksandry Kuźmińskiej dotyczą opracowania metody wytwarzania biomateriałów, które wg definicji Europejskiego Stowarzyszenia Biomateriałów, są substancjami innymi niż lek, które mogą być użyte jako całość lub część systemu zastępując tkankę lub organ, lub pełniąc jego funkcję. Biomateriały nie mogą w organizmie wywoływać alergii, uczulenia, reakcji immunologicznych oraz muszą być biozgodne i niekancerogenne. Obecnie obserwuje się duży wzrost zachorowań na choroby cywilizacyjne, do których zaliczają się między innymi choroby układu sercowo-naczyniowego. Z tego względu badania podjęte przez Doktorantkę

nad nowymi materiałami, które mogą być wykorzystane do wytwarzania protez naczyniowych są ważnym zagadnieniem z punktu widzenia ich praktycznych zastosowań w leczeniu chorób układu krążenia.

Syntetyczne protezy naczyniowe najczęściej wykonywane są z polimerów: politereftalanu etylu, politetrafluoroetyleny, polimetakrylanu metylu lub poliuretanu. Realizowane są też badania nad protezami naczyniowymi wytwarzanymi metodami inżynierii tkankowej, które mają właściwości naturalnych naczyń krwionośnych. Hodowla tkankowa komórek śródbłonna prowadzona jest wtedy na rusztowaniu, wykonanym najczęściej z mieszaniny elastyny i kolagenu, kwasu hialuronowego, fibryny lub kwasu poliglikolowego. Rusztowania te jednak nie zapewniają protezie właściwości mechanicznych, którymi powinna się charakteryzować. Innym rozwiązaniem jest wykorzystanie syntetycznych polimerów do hodowli tkankowej. Jednak materiały polimerowe, pomimo licznych zalet, nie wykazują wystarczającej biokompatybilności z organizmem człowieka. Dlatego, założeniem do zdefiniowania celu rozprawy doktorskiej było otrzymanie rusztowania tkankowego z poliuretanu, które charakteryzowałoby się większą bio- i hemozgodnością powierzchni oraz mogłoby zostać wykorzystane do otrzymywania sztucznych naczyń krwionośnych o małej średnicy. Sformułowane na tej podstawie cele rozprawy doktorskiej obejmowały dwa zagadnienia:

- 1) opracowanie metody otrzymywania cylindrycznej struktury o zadanej morfologii
- 2) opracowanie metody modyfikacji jej powierzchni.

Cele, które postawiła w pracy Pani mgr inż. Aleksandra Kuźmińska są ważne ze względu na ciągłe poszukiwanie i doskonalenie biomateriałów, z których mogą być wykonane implanty tak ważnych struktur organizmu, jakim są naczynia krwionośne.

Aby osiągnąć postawione cele, Doktorantka zaplanowała i zrealizowała cykl prac badawczych, który można podzielić na następujące etapy:

1) Otrzymanie cylindrycznych struktur poliuretanowych o założonych właściwościach

Do wytworzenia poliuretanowych rurek o małej średnicy Doktorantka wykorzystwała metodę inwersji faz, polegającą na naniesieniu na stalową matrycę warstwy roztworu polimeru, a następnie zanurzeniu jej w nierozpuszczalniku (Publikacja 1). Zbadała wpływ następujących parametrów na właściwości poliuretanowej rurki: rodzaj poliuretanu (wysokoelastyczny, średnioelastyczny, niskoelelastyczny) i stężenie polimeru w roztworze pierwotnym, skład nierozpuszczalnika, czas kontaktu naniesionej warstwy z nierozpuszczalnikiem oraz rodzaj i stężenie porogenu. Oceniała jakościowo otrzymane rurki poliuretanowe na podstawie zdjęć SEM. W kolejnym etapie materiały, charakteryzujące się najkorzystniejszą morfologią, zostały poddane analizie określającej średnicę porów, właściwości mechaniczne, porowatość oraz cytotoksyczność. Na podstawie tych badań Doktorantka określiła warunki otrzymywania cylindrycznych struktur polimerowych o pożądanej charakterystyce do zastosowania jako elementy protez naczyniowych. Otrzymane zaproponowaną metodą materiały cechowała jednorodna mikroporowata struktura powierzchniowa, jednorodna grubość ścianek, wysoki moduł Younga oraz brak toksyczności.

2) Otrzymanie poliuretanu o hydrofilowej powierzchni

Aby zwiększyć zwilżalność powierzchni poliuretanu, polepszyć jego hemozgodność oraz ułatwić adhezję komórek śródbłónka, Doktorantka poddała modyfikacji powierzchnię polimeru. Powierzchnia poliuretanów może być modyfikowana przez pokrycie powierzchni innym polimerem, umieszczenie na powierzchni związków biologicznie aktywnych lub upakowaniu na powierzchni poliuretanu ludzkich komórek, które naturalnie występują w układzie krwionośnym. W metodzie wykorzystanej przez Doktorantkę najpierw do powierzchni poliuretanu dołączono cząsteczki kwasu akrylowego w wyniku zastosowania reakcji rodnikowej polimeryzacji w obecności jonów Ce^{4+} , a następnie do grup kwasowych pochodzących od kwasu akrylowego przyłączono polipeptydy. Należy podkreślić, że zaproponowana przez zespół, w którym pracowała Doktorantka, reakcja przyłączenia cząsteczek kwasu akrylowego została przeprowadzona z pominięciem etapu wprowadzenia grup hydroksylowych. Pierwsze badania nad modyfikacją powierzchni polimerowej, zostały przeprowadzone na krążkach poliuretanowych (Publikacja 2). Określono w nich wpływ czasu reakcji, temperatury i stężenia kwasu akrylowego na stężenie grup karboksylowych na powierzchni zmodyfikowanego poliuretanu. Charakterystyka otrzymanych próbek materiału obejmowała wykonanie zdjęć SEM, analizę ilościową przyłączonych na powierzchni polipeptydów metodą ELISA, analizę FTIR-ATR, zawartość węgla, tlenu i azotu na powierzchni metodą XPS oraz pomiar kąta zwilżania. Na podstawie otrzymanych wyników Doktorantka stwierdziła, że zaproponowana metoda modyfikacji poliuretanu pozwala na otrzymanie biomateriału o zwiększonej hydrofilowości powierzchni, która jest efektem przyłączenia kwasu akrylowego i polipeptydów. W ramach prowadzonych w tym etapie badań, została opracowana też metodyka analizy peptydów z powierzchni poliuretanu wykorzystująca kolorymetryczne oznaczanie stężenia kompleksu powstającego w reakcji wydzielonych ze zmodyfikowanego polimeru aminokwasów z kwasem bicynchoninowym (Publikacja 3). Prace nad przygotowaniem metodyki obejmowały określenie warunków prowadzenia analizy: czas i temperaturę tworzenia analizowanych kompleksów oraz wskazanie czynników mogących wpływać na wyniki oznaczeń zawartości peptydów w analizowanych próbkach materiału. Stwierdzono, że wzrost mierzonej absorbancji rośnie ze wzrostem temperatury i czasu analizy oraz że niemodyfikowany peptydami poliuretan reaguje z kwasem bicynchoninowym, dlatego konieczne jest wyznaczenie różnicy między wartościami absorbancji otrzymanymi dla próbek polimeru z naniesionymi peptydami i dla próbek polimeru przed przyłączeniem peptydów. Następnie Doktorantka zbadała możliwość zasiedlenia zmodyfikowanej powierzchni krążków poliuretanu komórkami śródbłónka (Publikacja 4). Przed wykonaniem testów adhezji komórek oraz sprawdzeniem hemozgodności, wykonana została szczegółowa analiza materiałów przygotowanych wg wcześniej opracowanej metody (przedstawionej w Publikacji 2). Zbadano morfologię powierzchni modyfikowanych krążków poliuretanowych na podstawie zdjęć SEM, przeprowadzono analizę składu pierwiastkowego metodą XPS, analizę grup funkcyjnych metodą FTIR, kąt zwilżania, stabilność przygotowanego materiału polimerowego, stężenie grup karboksylowych na powierzchni materiału po pierwszym etapie modyfikacji oraz stężenie peptydów po unieruchomieniu ich na powierzchni

materiału. Następnie wykonano testy adhezji płytek krwi, adsorpcji fibrynogenu oraz czasu koagulacji w celu określenia hemozgodności zmodyfikowanych powierzchni oraz zbadano wzrost komórek śródbłónka na otrzymanym biomateriale. Otrzymane wyniki wskazują, że wykorzystana przez Doktorantkę metoda modyfikacji poliuretanu, powoduje zwiększenie hydrofilowości powierzchni, co zmniejsza adsorpcję fibrynogenu i adhezję płytek krwi, co jest korzystną cechą biomateriału, który ma być wykorzystany do produkcji implantów naczyniowych. Ponadto przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na stwierdzenie zależności między stężeniem grup karboksylowych a zasiedlaniem biomateriału przez komórki śródbłónka. Kolejne badania zostały wykonane z wykorzystaniem struktur utworzonych z włókien poliuretanu wyprodukowanych metodą rozdmuchową (Publikacja 5). W badaniach tych wykazano, że opracowana metoda modyfikacji powierzchni może być zastosowana do porowatych materiałów poliuretanowych otrzymanych z włókien. Jednak aby uzyskać powierzchnię włóknistych cylindrycznych struktur charakteryzującą się jednorodną morfologią konieczne było dostosowanie warunków procesowych podczas modyfikacji ich powierzchni. Ostatnia faza badań prowadzonych w kierunku otrzymania hydrofilowej powierzchni była prowadzona na porowatych cylindrycznych strukturach polimerowych otrzymanych metodą inwersji faz (Publikacja 6). W tych badaniach zastosowano wcześniej opracowaną metodę wytwarzania modelowych porowatych cylindrycznych struktur polimerowych oraz dwustopniową metodę modyfikacji ich powierzchni w wyniku przyłączenia kwasu akrylowego, a następnie peptydów. Właściwości otrzymanych modyfikowanych poliuretanów zostały scharakteryzowane na podstawie zdjęć SEM, analizy składu pierwiastkowego na powierzchni metodą XPS, analizy FTIR, pomiaru kąta zwilżania, porowatości, właściwości mechanicznych oraz analizy gęstości grup karboksylowych. Ponadto określono ich cytotoksyczność oraz oddziaływanie z komórkami śródbłónka oraz komórkami mięśniowymi. Otrzymane wyniki potwierdziły, że otrzymane biomateriały posiadają właściwości wymagane od materiałów do zastosowań jako protezy naczyń krwionośnych.

3) Modyfikacja powierzchni poliuretanu hydrożelem

Ostatnim etapem badań ocenianej pracy doktorskiej było otrzymanie poliuretanowych cylindrycznych struktur, których powierzchnia została pokryta warstwą hydrożelu na bazie poliwinylpirolidonu (PVP) (Publikacja 7). Wprowadzenie hydrożelu jest sposobem otrzymywania materiałów o powierzchni biopasywnej. Biomateriały tego typu charakteryzują się mniejszą adhezją białek i komórek. Wcześniejsze prace wykonane w zespole prof. Tomasza Ciacha, wykazały, że możliwa jest modyfikacja powierzchni poliuretanowych dysków z wykorzystaniem hydrożelu PVP. Doktorantka zastosowała tę metodę i otrzymała biomateriał w postaci cylindrycznych kształtek o małej średnicy. Wewnętrzna powierzchnia poliuretanowych rurek została zmodyfikowana warstwą hydrożelu związanego z podłożem wiązaniami powstałymi w reakcji typu Fentona. Otrzymany biomateriał został scharakteryzowany z wykorzystaniem zdjęć SEM, analizy FTIR-ATR, oznaczenia zawartości wprowadzonego hydrożelu, pomiaru kąta zwilżania oraz testów pozwalające ocenić jego cytotoksyczność. Na podstawie przeprowadzonych badań

Doktorantka stwierdziła, że parametry procesowe zastosowane do wprowadzenia PVP na powierzchnię polimeru mają wpływ na grubość warstwy hydrożelowej i jej zwilżalność. Potwierdziła też, że obecność hydrożelu PVP korzystnie wpływa na bezpieczeństwo biomateriału w kontakcie z żywymi komórkami.

Ocena merytoryczna pracy

Tematyka ocenianej rozprawy doktorskiej jest ciekawa i istotna z punktu widzenia poszukiwań metod wytwarzania rusztowań tkankowych, które mogą zostać wykorzystane jako protezy naczyń krwionośnych. Zgodnie z informacją zawartą we wprowadzeniu, obecnie trwają badania *in vivo* otrzymanych biomateriałów, co świadczy o możliwości ich praktycznego zastosowania. Na podstawie przedstawionych wyników badań opisanych w cyklu artykułów naukowych mogę stwierdzić, że Doktorantka osiągnęła zaplanowane cele. Opracowała metodę otrzymywania cylindrycznych rusztowań poliuretanowych, modyfikowanych kwasem akrylowym oraz peptydami, co stanowi oryginalne rozwiązanie sformułowanego problemu badawczego. Analiza opisu przeprowadzonych prac badawczych, dyskusji wyników i przedstawionych wniosków zawartych w artykułach naukowych w połączeniu z załączonymi oświadczeniami współautorów publikacji wskazują na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Panią mgr inż. Aleksandrę Kuźmińską. Wprowadzenia teoretyczne w opublikowanych artykułach naukowych świadczą o tym, że Kandydatka prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie naukowej Inżynieria chemiczna.

Za najważniejsze wyniki badań, które wnoszą istotne elementy nowości do rozwoju metod otrzymywania rusztowań poliuretanowych uważam:

- opracowanie metody wytwarzania cylindrycznych rusztowań poliuretanowych charakteryzujących się morfologią i właściwościami mechanicznymi odpowiednimi do zastosowań jako protezy naczyniowe
- opracowanie metody modyfikacji powierzchni poliuretanu z wykorzystaniem dwuetapowej reakcji, w wyniku której na powierzchni poliuretanu są przyłączone cząsteczki kwasu akrylowego oraz peptydy
- otrzymanie cylindrycznych struktur poliuretanowych z wewnętrzną powłoką biopasywną wykonaną z hydrożelu na bazie poliwinylpirolidonu
- wykazanie, że otrzymane biomateriały charakteryzują się dobrą biogodnością i hemozgodnością.

Do obowiązków recenzenta należy też wskazanie zauważonych niedociągnięć w ocenianej pracy.

Moim zdaniem we wprowadzeniu do cyklu publikacji zabrakło szerszego omówienia biomateriałów wykorzystywanych do wytwarzania protez naczyniowych. Takie pogłębione przedstawienie problemu, lepiej oddawałoby kontekst przeprowadzonych badań. We wprowadzeniu nie znalazłam uzasadnienia, dlaczego modyfikację powierzchni powłoką biopasywną prowadzono na cylindrycznych strukturach otrzymanych metodą inwersji faz

z nierozpuszczalnikiem woda/etanol 40:60, podczas gdy wcześniej przedstawione wyniki badań nad doborem parametrów otrzymywania poliuretanowych rurek wskazują, że najkorzystniejszą morfologię polimerowych rusztowań otrzymuje się, gdy nierozpuszczalnikiem jest czysty etanol.

Recenzowana rozprawa doktorska jest zredagowana poprawnie. W tekście pracy zauważyłam nieliczne błędy stylistyczne, a dwa rysunki zamieszczone we wprowadzeniu (Rysunek 4, Rysunek 6) są gorszej jakości, co utrudnia ich analizę. Poza tym za dyskusyjne uważam stosowanie nazwy „roztwór” w odniesieniu do czystego etanolu czy czystej wody.

Powyższe uwagi nie mają wpływu na ogólną wysoką ocenę recenzowanej rozprawy doktorskiej. Przedstawione przez Panią mgr inż. Aleksandrę Kuźmińską wyniki badań świadczą o osiągnięciu postawionych w pracy celów. Opracowana metoda otrzymywania cylindrycznych rusztowań tkankowych i ich modyfikacji może przyczynić się do rozwoju technologii wytwarzania protez naczyniowych.

Ocena zastosowanego piśmiennictwa

Bibliografia zawarta w rozprawie doktorskiej liczy 83 pozycje. Zdecydowaną większość cytowanej literatury stanowią artykuły naukowe opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, przy czym większość z nich została opublikowana w ostatnich dziesięciu latach. Potwierdza to aktualność prowadzonych badań, a dobór cytowanej literatury świadczy o dobrej orientacji Doktorantki w tematyce otrzymywania i charakterystyki biomateriałów.

Podsumowanie

Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr inż. Aleksandry Kuźmińskiej pt. „Otrzymywanie i modyfikacja powierzchni poliuretanowych cylindrycznych rusztowań tkankowych” przedstawia oryginalne wyniki badań nad metodami wytwarzania biomateriałów, wskazujące na możliwości wykorzystania otrzymanych cylindrycznych struktur poliuretanowych o modyfikowanej powierzchni jako rusztowania naczyń krwionośnych. Otrzymane w tej pracy wyniki badań stanowią istotny wkład w dziedzinie badań nad metodami wytwarzania materiałów do zastosowań biomedycznych.

Na tej podstawie stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65 poz. 595 wraz z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Politechniki Warszawskiej o jej przyjęcie i dopuszczenie Pani mgr inż. Aleksandry Kuźmińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Donata Kowopach - tytus