

**WYDZIAŁ CHEMII**

dr hab. Łukasz JOHN
Kierownik Zespołu Chemii Biomateriałów
Zakład Technologii Chemicznej
ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław
e-mail: lukasz.john@chem.uni.wroc.pl

Wrocław, 21.12.2021 r.

RECENZJA¹

**rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Aleksandry Kuźmińskiej
pt. „Otrzymywanie i modyfikacja powierzchni poliuretanowych cylindrycznych rusztowań
tkankowych”**

Powierzona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Aleksandry Kuźmińskiej została wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr. hab. inż. Tomasza Ciacha i promotor pomocniczej Pani dr inż. Beaty Butruk-Raszeji w Laboratorium Inżynierii Biomedycznej w Zakładzie Biotechnologii i Inżynierii Procesowej Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej. Tytuł dysertacji jest aktualny i ciekawy, doskonale wpisujący się w obszary badawcze z wielkimi sukcesami eksplorowane przez Promotora pracy.

Choroby układu krążenia są aktualnie jedną z najczęstszych przyczyn zgonów w Polsce. Niestety sytuacji nie poprawia coraz lepsza diagnostyka i rosnąca świadomość społeczna, a liczby są co najmniej alarmujące. W naszym kraju, według danych GUS, każdego roku z powodu chorób układu krążenia umiera ok. 200 tysięcy osób, co jest spowodowane niehigienicznym trybem życia, a zachorowalność jest średnio o 50% większa niż na Zachodzie. Z tą tematyką związana jest przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, która nawiązuje do opracowania precyzyjnych odpowiednio zmodyfikowanych elastomerów poliuretanowych o potencjalnym zastosowaniu w gojeniu przeszczepów naczyniowych. Aktualnie intensywnie poszukuje się biomateriałów mechanicznie dopasowanych do natywnych naczyń, wykazujących lepszą integrację, gojenie, poprawiających wydajność przeszczepu oraz podobnych pod względem właściwości mechanicznych do naturalnych naczyń. Ponadto, oczekuje się, że protezy najnowszej generacji będą nie tylko wspomagały gojenie, ale jednocześnie łagodziły towarzyszące wszczepom zjawisko otaczania implantu przez nieunaczynioną, sztywną, kolagenową otoczkę (tzw. tworzenie FBC, z ang. *foreign body capsule*).

Praca doktorska p. mgr inż. A. Kuźmińskiej przygotowana została w postaci spójnego tematycznie cyklu oryginalnych artykułów. Na rozprawę Kandydatki składa się 7 prac z listy

¹ Druga, poprawiona wersja recenzji uwzględniająca erratę do rozprawy doktorskiej.

**WYDZIAŁ CHEMII**

dr hab. Łukasz JOHN
Kierownik Zespołu Chemii Biomateriałów
Zakład Technologii Chemicznej
ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław
e-mail: lukasz.john@chem.uni.wroc.pl

Journal Citation Reports (JCR) oraz 1 patent polski. Artykuły naukowe zostały opublikowane w dobrych i bardzo dobrych czasopismach o międzynarodowej cyrkulacji, takich jak: *Journal of Molecular Sciences* (IF₂₀₂₀ = 5,924; praca **P6**), *Colloids and Surfaces B – Biointerfaces* (IF₂₀₂₀ = 5,268; praca **P7**), *Materials* (IF₂₀₂₀ = 3,623; praca **P1**), *Surface Innovations* (IF₂₀₂₀ = 3,016; praca **P4**), *Coatings* (IF₂₀₂₀ = 2,881; praca **P5**), *BioTechniques* (IF₂₀₂₀ = 1,993; praca **P3**) i *Open Chemistry* (IF₂₀₂₀ = 1,554; praca **P2**). Cel, jaki postawiła przed sobą Doktorantka, dotyczył opracowania kompletnych i efektywnych implantów naczyniowych, cechujących się małym przekrojem (<6 mm). Doktorantka opracowała metodę otrzymywania protez naczyniowych o cylindrycznej strukturze, określonej morfologii i porowatości oraz zmodyfikowanej chemicznie powierzchni. Analiza oświadczeń współautorów nie pozostawia wątpliwości, że Kandydatka miała wiodący udział w otrzymywaniu i analizie badanych biomateriałów. Warto również podkreślić, że ze względu na fakt, że praca ma charakter interdyscyplinarny, trudno oczekiwać od Autorki dysertacji, aby była biegłym ekspertem w każdym z obszarów, szczególnie w tych, które daleko wykraczają poza inżynierię materiałową.

Materiały przygotowane do recenzji są w postaci „spinki” zawierającej podstawowe dane dot. dorobku publikacyjnego, streszczenie w języku polskim i angielskim (to drugie znacznie lepiej napisane), spis stosowanych skrótów, autoreferat, oświadczenia współautorów prac oraz kopie artykułów.

Autoreferat podzielony został na dwie zasadnicze części – część literaturową oraz opis wyników badań własnych. W części pierwszej Autorka pracy wprowadza czytelnika w obszar tematyczny rozprawy, a następnie formułuje cel i zakres swoich poszukiwań, po których przechodzi do właściwej części literaturowej. W przeglądzie tym Autorka opisuje wiodącą grupę biomateriałów naczyniowych jaką są poliuretany oraz szereg zjawisk biologicznych jakie mogą występować na pograniczu faz implant/otaczające środowisko. Następnie przechodzi do omówienia metod wytwarzania struktur cylindrycznych – skupiając się na opisie wytwarzania materiałów włóknistych i metodzie polegającej na inwersji faz, która jest alternatywą dla elektroprzędzenia (z ang. *electrospinning*, *ES*) i rozdmuchu roztworu polimeru (z ang. *solution blow spinning*, *SBS*). Inwersja faz, jak podaje Autorka, jest prostą metodą, która w przeciwieństwie do tych dwóch pierwszych jest tania, nie wymagająca skomplikowanej aparatury i stosowania kosztownych, często toksycznych rozpuszczalników. W kolejnej części, Kandydatka omawia możliwości modyfikacji łańcuchów polimerowych, odwołując się do powierzchni biopasywnych i bioaktywnych. Na zakończenie zwraca uwagę na tzw. proces endotelializacji powierzchni, który polega na oddziaływaniu powierzchniowych receptorów błonowych komórki z określonymi grupami funkcyjnymi zakotwiczonymi do

**WYDZIAŁ CHEMII**

dr hab. Łukasz JOHN
Kierownik Zespołu Chemii Biomateriałów
Zakład Technologii Chemicznej
ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław
e-mail: lukasz.john@chem.uni.wroc.pl

polimeru. W mojej opinii część literaturowa została opracowana poprawnie. Autorka odwołuje się w niej do 81 aktualnych i anglojęzycznych odnośników literaturowych. Poza tym, jest napisana w dojrzały sposób wskazujący na bardzo dobrą znajomość Doktorantki aktualnego stanu wiedzy w eksplorowanym obszarze badań. Cytowana literatura uwzględnia dawne i obecne trendy badań oraz najistotniejsze, reprezentatywne publikacje związane z tematyką rozprawy doktorskiej. Mimo tego, Autorka nie ustrzegła się pewnych niezręczności językowych, stylistycznych i usterek edytorskich. Na przykład: na stronie 21, we wstępie jest zdanie, które pozostawia rozległy niedosyt informacyjny: „Odpowiednio porowata struktura i odpowiednie właściwości mechaniczne powinny zapewniać odpowiednie warunki do proliferacji komórek.” Odpowiednie, czyli jakie? Z kolei na stronie 23, w celu i zakresie rozprawy, Kandydatka używa określenia: „...opracowanie metody wolnorodnikowej modyfikacji powierzchni z użyciem jonów cerów...”, co mnie, jako chemika, wprowadziło w zakłopotanie. Poza tym, Autorka dość swobodnie i zamiennie stosuje pojęcie „cząstka” versus „cząsteczka”, co nie jest prawidłowe (np. na stronie 29).

Chciałbym w tym miejscu stanowczo podkreślić, że te drobne usterki w żadnej mierze nie wpływają na ogólną ocenę, a zawartość treści przedstawionych w części literaturowej jest adekwatna do opisanych w dyskusji wyników i zrealizowanych badań.

W dalszym fragmencie autoreferatu, Doktorantka przechodzi do najciekawszej w mojej ocenie części, tj. dyskusji wyników badań własnych. Część doświadczalna została klarownie podzielona na wątki, które odnoszą się do: (I) dobrania parametrów procesowych prowadzących do powtarzalnego otrzymywania cylindrycznych struktur, ze szczególnym naciskiem na właściwości mechaniczne i porowatość powierzchniową (podstawę stanowi praca **P1**); (II) modyfikacji otrzymanych materiałów bioaktywną powłoką zawierającą: jony ceru(IV) i kwas akrylowy na foliach poliuretanowych (prace **P2** i **P3**) oraz krótkie sekwencje peptydowe (praca **P4**); (III) modyfikacji struktur cylindrycznych za pomocą jonów ceru(IV) i kwasem akrylowym stosując metody SBS (praca **P5**) i IF (praca **P6**); oraz (IV) interakcji otrzymanych biomimetycznych protez z komórkami śródbłonka i krwią ludzką (praca **P6**). Taki podział osobiście uważam za przemyślany, kompletny i stanowiący dobrze udokumentowaną podstawę pozwalającą myśleć o realnych zastosowaniach wytworzonych biomateriałów; krok już w tym kierunku został poczyniony, czego dowodem jest patent polski zatytułowany „Sposób wytwarzania protez naczyniowych małych średnic.”, którego współautorką jest p. mgr inż. Kuźmińska.

Ponieważ podstawą tego co powyżej są opublikowane prace (**P1-P6**), które z sukcesem przeszły już wymagający proces recenzencki, w dalszej części odniosę się do

**WYDZIAŁ CHEMII**

dr hab. Łukasz JOHN
Kierownik Zespołu Chemii Biomateriałów
Zakład Technologii Chemicznej
ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław
e-mail: lukasz.john@chem.uni.wroc.pl

najciekawszych według mnie wątków, jakie zostały w tych artykułach poruszone. W pracy **P1** opisano badania związane z oceną wpływu wybranych parametrów procesowych na morfologię cylindrycznych rusztowań tkankowych. Jako matrycy użyto „wycinki” ze stali nierdzewnej o średnicy 6 mm. Badaniom poddano 4 rodzaje roztworów poliuretanów (PU) o stężeniach 10, 15, 20 i 25% (wag./obj.) w obecności roztworów nierozpuszczalników o składzie woda/etanol (o stosunkach: 100/0, 80/20, 60/40, 40/60, 20/80, 0/100). Matryca zanurzona była w mediach przez 10 minut, 2 i 24 godziny. Następnie, materiały osuszono w temperaturze pokojowej w atmosferze podwyższonej wilgotności. Ponadto, zbadano dodatek (5 i 10% wag./obj.) porogenu, takich jak chlorek sodu, alkohol poliwinylowy (PVA) oraz heksan, i ich wpływ na porowatość powierzchniową. Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, że najbardziej obiecującym wariantem procesu jest zastosowanie 20% (wag./obj.) roztworu PU, etanolu jako nierozpuszczalnika (0/100 = woda/EtOH) i 24 godzinna ekspozycja w medium. Ponadto, przy zastosowaniu 10% dodatku PVA jako porogenu, otrzymano najkorzystniejszą morfologię powierzchni, przy jednoczesnym zwiększeniu grubości ścianek, powodując problematyczne zwiększenie sztywności i obniżenie elastyczności materiału. Z kolei, analiza testem aktywności cytotoksycznej (MTT) wykazała brak toksyczności komórkowej otrzymanych materiałów, zarówno z dodatkiem, jak i bez dodatku porogenu. Autorka przy opisie wpływu kompozycji nierozpuszczalnika na morfologię materiału powołuje się na „...artefakty znalezione na ich powierzchni wewnętrznej [które] występowały w stosunkowo niewielkich ilościach.” (opis na stronie 33). O jakie artefakty w tym opisie chodzi? Proszę o doprecyzowanie. Mam również uwagę do stosowania określenia „zdjęcia SEM” (np. strony 33-35 i dalej). Ponieważ skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) jest metodą obrazowania, to prawidłowym określeniem jest „obraz SEM”. Ponadto, w mojej ocenie, w tabeli 1 (strona 34) dla porównania zabrakło parametrów związanych z wybranymi właściwościami mechanicznymi, takimi jak moduł Younga, wytrzymałość na rozciąganie i wydłużenie przy zerwaniu, występujących w naturalnych naczyniach krwionośnych.

Po wybraniu najkorzystniejszych materiałów, Doktorantka przystąpiła do powierzchniowej modyfikacji materiałów na bazie PU, której celem było zwiększenie zwilżalności powierzchni, hemozgodności oraz adhezji komórek śródbłonna (EC, z ang. *endothelial cells*) do biomateriału. Funkcjonalizacja powierzchni jest niezbędna, ponieważ poliuretan nie posiada grup funkcyjnych, do których można efektywnie przyłączyć biomolekuły. Dlatego, aby to umożliwić, do PU przyłączano kwas akrylowy, wprowadzając możliwie najwięcej grup karboksylowych, do których następnie można było zakotwiczyć krótkie sekwencje peptydowe typu REDV i YIGSR. Inną, równie ważną, funkcją grup

**WYDZIAŁ CHEMII**

dr hab. Łukasz JOHN
Kierownik Zespołu Chemii Biomateriałów
Zakład Technologii Chemicznej
ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław
e-mail: lukasz.john@chem.uni.wroc.pl

karboksylowych było zapewnienie odpowiedniej odległości pomiędzy powierzchnią materiału, a peptydem. Przeprowadzone w tym kontekście badania wykazały, że komórki śródbłonna efektywniej adherują do powierzchni zawierających krótkie peptydy, ale jednocześnie stężenie zakwaszających środowisko grup karboksylowych nie może być zbyt duże. Stąd zdecydowano, że optymalne stężenie kwasu akrylowego powinno wynosić 1%. Aktywacji powierzchni dokonano za pomocą jonów ceru(IV). W tym miejscu proszę Doktorantkę o doprecyzowanie o jaką aktywację tutaj chodzi. Zwracam również uwagę, że podawana przez Kandydatkę nazwa „siarczan amonu ceru (IV)” (strona 45 i dalej) dla związku z anionem koordynacyjnym o wzorze $(\text{NH}_4)_4[\text{Ce}(\text{SO}_3)_4]$ jest nieprawidłowa; ponadto, zgodnie z zaleceniami Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC), nazwa „kwas azotowy” (strona 45 i dalej) nie jest kompletna.

W kolejnym etapie pracy prowadzono badania modyfikacji materiałów cylindrycznych wytworzonych dwiema metodami, tj. metodą rozdmuchu polimeru (SBS) oraz inwersji faz (IF). W przypadku metody SBS, morfologia powierzchni materiału PU_REDV posiadała błonkową strukturę pomiędzy włóknami oraz pory o średniej wielkości poniżej 10 μm , co jest pożądane w kontekście adhezji komórek śródbłonna. Ponadto, dzięki wysokiej porowatości całkowitej, jaką wykazują sfunkcjonalizowane materiały, zapewnia się komórkom efektywną wymianę gazową oraz ułatwiony dostęp do składników odżywczych. Dodatkowo wykazano, że opracowana modyfikacja pozwoliła na otrzymanie materiału o zbliżonej wartości modułu Younga, jaka występuje w ludzkich naczyniach wieńcowych.

Drugą zastosowaną metodą modyfikacji materiałów była metoda inwersji faz (nie jak Autorka omyłkowo podaje w tytule rozdziału 4.2.3: „...rozdmuchu inwersji faz.”) otrzymując elastyczne struktury cylindryczne powstałe w wyniku inwersji faz kwasu akrylowego i dwóch krótkich sekwencji peptydowych. W tym przypadku nie stosowano dodatku porogenu. Badania wykazały zwiększoną zwilżalność powierzchni, co odczytuje się korzystnie z punktu oceny biogodności materiału. Podobnie jak materiał otrzymany metodą rozdmuchu polimeru, test MTT dla biomateriału otrzymanego metodą IF wykazał brak efektu cytotoksycznego, a dzięki obecności sekwencji peptydowych, komórki śródbłonna adherują, przeżywają i proliferują na jego powierzchni, jednocześnie nie zwiększając istotnie aktywności komórek mięśniowych (SMC, z ang. *smooth muscle cells*). Z kolei, analiza interakcji zmodyfikowanych materiałów z krwią potwierdziła wysoką hemozgodność i zmniejszenie

**WYDZIAŁ CHEMII**

dr hab. Łukasz JOHN
Kierownik Zespołu Chemii Biomateriałów
Zakład Technologii Chemicznej
ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław
e-mail: lukasz.john@chem.uni.wroc.pl

aktywności płytek krwi na powierzchni materiałów, co mogłoby sprzyjać tworzeniu czopów zakrzepowych.

Ostatnim etapem badań, przeprowadzonych przez Doktorantkę, była modyfikacja powierzchni struktur cylindrycznych otrzymanych metodą inwersji faz za pomocą hydrożelu na bazie poliwinylpiperolidonu (PVP). W celu zbadania wpływu na właściwości powłoki hydrożelowej zastosowano różne stężenia PVP i wodorodadtlenku kumenu (CHP, z ang. *cumene hydroperoxide*) pełniącego rolę inicjatora polimeryzacji. Wykazano, że wraz ze wzrostem stężenia PVP otrzymywano grubsze warstwy hydrożelu, natomiast zwiększenie stężenia inicjatora powodowało wzrost hydrofilowości materiału. Test MTT wypadł pozytywnie i potwierdził brak cytotoksyczności, a analiza z krwią wykazała wysoką hemozgodność hydrożelowej warstwy. Ponadto, zaobserwowano zmniejszenie adsorpcji fibrynogenu oraz zmniejszenie adhezji płytek krwi, czego oczekuje się od tego typu powłok.

Resumując część doświadczalną stwierdzam, że **Doktorantka w pełni wywiązała się z postawionych przed nią zadań, a Jej badania doprowadziły do otrzymania nowatorskich biomateriałów dla protez naczyniowych, co uważam za osiągnięcie samo w sobie.**

Na pozostały dorobek naukowy Kandydatki składa się 10 publikacji, w tym 9 z listy JCR. Są to artykuły opublikowane w takich czasopismach jak: *Materials Science & Engineering C* (IF₂₀₂₀ = 7,328; 1 praca), *Colloids and Surfaces B* (IF₂₀₂₀ = 5,268; 4 prace), *Macromolecular Bioscience* (IF₂₀₂₀ = 4,979; 2 prace), *Chemical Engineering and Processing* (IF₂₀₂₀ = 4,237; 1 praca), *Chemical and Process Engineering* (IF₂₀₂₀ = 0,485; 1 praca) i *Acta Scientiarum Polonorum – Biotechnologia* (spoza listy JCR; 1 praca). Łącznie, p. mgr inż. Kuźmińska, jest Autorką 16 artykułów naukowych o łącznym współczynniku oddziaływania 67,339, co daje bardzo dobrą średnią 4,209 (z 16 artykułów z listy JCR). Z kolei, Jej indeks Hirscha, według bazy SCOPUS, wynosi 7 (dane z dnia 21.12.2021). Ponadto, Kandydatka wykazała się umiejętnością pozyskiwania funduszy na badania zdobywając grant PRELUDIUM finansowany przez Narodowe Centrum Nauki (projekt o numerze rejestracyjnym 2016/21/N/ST08/01953, zatytułowany „Wpływ parametrów procesowych na wielkość porów powierzchniowych poliuretanowych struktur cylindrycznych o małych średnicach.”) oraz była/jest wykonawcą dwóch projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, tj. w grantach LIDER „BioGraft – biomimetyczne protezy naczyniowe małych średnic.” (nr rej. LIDER/18/0104/L-8/16/NCBR/2017) oraz projekcie polsko-tajwańskim „Surface modification of polyurethane vascular graft.” (nr rej. PL-TWII/II/2015). Wyniki badań prezentowała na 11 międzynarodowych i lokalnych konferencjach głównie w Polsce.

**WYDZIAŁ CHEMII**

dr hab. Łukasz JOHN
Kierownik Zespołu Chemii Biomateriałów
Zakład Technologii Chemicznej
ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław
e-mail: lukasz.john@chem.uni.wroc.pl

Niewątpliwie dotychczasowy dorobek Kandydatki jest wyróżniający, biorąc pod uwagę początkowy etap kariery naukowej.

Reasumując, przedstawiona do recenzji **praca doktorska Pani mgr inż. Aleksandry Kuźmińskiej jest na wysokim poziomie merytorycznym i zawiera elementy nowości naukowej.** W związku z tym, bez żadnych wątpliwości stwierdzam, że poziom dysertacji spełnia wymogi i warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” oraz w §5 ust. 1 „Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora” (Dz. U. z 2018 r. poz. 261) oraz na podstawie art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. „Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669) stawiane pracom składanym przez osoby ubiegające się o stopień naukowy doktora (w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych, dyscyplina inżynieria chemiczna) i **wnioskuje o dopuszczenie Autorki do dalszych etapów postępowania doktorskiego.**

Pracę doktorską Pani mgr inż. Aleksandry Kuźmińskiej oceniam jako bardzo dobrą. Doktorantka w pełni dostosowała się do postawionych przed nią wymagań. **Praca jest na wysokim poziomie merytorycznym oraz zawiera elementy nowości naukowej.** Opisane badania prowadzone były w ramach realizacji kierowanego przez Doktorantkę grantu PRELUDIUM oraz w ramach dwóch innych grantów, w których Kandydatka była wykonawcą. W związku z tym, **z przekonaniem zwracam się z wnioskiem do Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Politechniki Warszawskiej o rozważenie wyróżnienia przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej.** Przemawia za tym materiał zawarty w dokumentacji, ale przede wszystkim aktualność prowadzonych badań i portfolio Kandydatki.