

dr hab. inż. Dorota Lewińska, profesor
Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej
im. Macieja Nałęcza PAN
ul. Księcia Trojdena, 02-109 Warszawa

Warszawa, 09.01.2025 r.

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Mohammada Ali Haghighat Bayana
pt.: „Stimuli-Responsive Polymer Nanomaterials for Biomedical Applications”**

Promotor: dr hab. Filippo Pierini

Promotor pomocniczy: dr Paweł Nakielski

Recenzja została wykonana na prośbę prof. dr hab. inż. Zbigniewa Ranachowskiego Sekretarza Rady Naukowej Instytutu Podstawowych Problemów Techniki PAN, zawartą w piśmie z dnia 13 listopada 2024 r.

Obserwowany w ciągu ostatnich 50 lat gwałtowny rozwój inżynierii materiałowej, dyscypliny skupiającej się na projektowaniu, badaniu i wytwarzaniu nowych materiałów, charakteryzujących się ściśle określonymi właściwościami w istotny sposób stymuluje postęp innych dyscyplin, w tym także inżynierii biomedycznej. Nowe, wysoce specjalistyczne materiały znajdują tu liczne zastosowania, począwszy od ochrony osobistej, poprzez szeroko pojętą prewencję i diagnostykę, a skończywszy na nowoczesnych, spersonalizowanych terapiach i medycynie regeneracyjnej. Wytwarzanie materiałów o konkretnych cechach i właściwościach możliwe jest dzięki zastosowaniu nowoczesnych technologii takich jak między innymi nanotechnologie, a wśród nich technika elektroprzędzenia roztworów polimerów. W tym właśnie obszarze umiejscowiona jest rozprawa doktorska mgr inż. Bayana.

Tematyka rozprawy, jej struktura i cele

Dysertacja bazuje na zbiorze czterech publikacji, które powstały przy współudziale Doktoranta. Artykuły te opublikowano w latach 2022-2024 w czasopismach z listy JCR, o wysokich współczynnikach wpływu od 3,4 do 27,4 i liczbie punktów MNiSzW od 20 do 200. Są to następujące artykuły:

1. Anna Zakrzewska†, Mohammad Ali Haghighat Bayan†, Paweł Nakielski, Francesca Petronella, Luciano De Sio, and Filippo Pierini. "Nanotechnology transition roadmap toward multifunctional stimuli-responsive face masks." ACS Applied Materials & Interfaces (2022): 46123-46144.
2. Mohammad Ali Haghighat Bayan, Yasmin Juliane Dias, Chiara Rinoldi, Paweł Nakielski, Daniel Rybak, Yen B. Truong, Alexander L. Yarin, and Filippo Pierini. "Near-infrared light activated core-shell electrospun nanofibers decorated with photoactive plasmonic nanoparticles for on-demand smart drug delivery applications." Journal of Polymer Science 61, no. 7 (2023): 521-533.
3. Mohammad Ali Haghighat Bayan, Chiara Rinoldi, Daniel Rybak, Seyed Shahrooz Zargarian, Anna Zakrzewska, Olga Cegielska, Kaisa Põhako-Palu, Shichao Zhang, Agata Stobnicka-Kupiec, Rafał L Górny, Paweł Nakielski, Karin Kogermann, Luciano De Sio, Bin Ding, and Filippo Pierini. "Engineering surgical face masks with photothermal and

photodynamic plasmonic nanostructures for enhancing filtration and on-demand pathogen eradication." *Biomaterials Science* 12, no. 4 (2024): 949-963. 26

4. Mohammad Ali Haghighat Bayan, Chiara Rinoldi, Alicja Kosik-Kozioł, Magdalena Bartolewska, Daniel Rybak, Seyed Shahrooz Zargarian, Syed Ahmed Shah, Zuzanna J. Krysiak, Shichao Zhang, Massimiliano Lanzi, Paweł Nakielski, Bin Ding, and Filippo Pierini. "Solar-to- NIR Light Activable PHBV/ICG Nanofiber-Based Face Masks with On-Demand Combined Photothermal and Photodynamic Antibacterial Properties." *Advanced Materials Technologies*: 2400450.

Rozprawa napisana jest w języku angielskim, składa się z kolorowych reprintów czterech publikacji, poprzedzonych 44-stronnicowym wstępem wzbogaconym ośmioma rysunkami zaczerpniętymi głównie z publikacji własnych Doktoranta. Wstęp stopniowo wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy, krótko omawiając technikę elektroprzędzenia, budowę i zasadę działania materiałów reagujących na bodźce zewnętrzne, w szczególności elektroprzędzonych, przechodząc następnie do zastosowań elektroprzędzonych włókien w inteligentnych systemach dostarczania leków oraz w sprzęcie ochrony osobistej takim jak maseczki na twarz. W tekście Kandydat powołuje się na 92 publikacje źródłowe.

Następnie Doktorat sformułował cel swojej pracy, którym było zaprojektowanie zaawansowanych elektroprzędzonych nanowłókien o wielofunkcyjnych właściwościach do zastosowań biomedycznych, ze szczególnym uwzględnieniem zwiększonej ochrony i dostarczania terapii „na żądanie”.

Realizacja tego zadania obejmowała trzy główne etapy prac eksperymentalnych:

1. wytworzenie i charakterystyka zaproponowanych nanowłókien o właściwościach fototermicznych i fotodynamicznych zawierających wybrane substancje fotoaktywne
2. analiza ich struktury i wybranych właściwości fizykochemicznych oraz
3. ocena funkcjonalna wytworzonych materiałów.

Na zakończenie tej części rozprawy Kandydat zamieścił dwustronicowe streszczenia poszczególnych artykułów wchodzących w skład dysertacji oraz trzy-stronnicowe konkluzje.

Pierwsza z cyklu publikacja, w której Kandydat jest drugim autorem, mającym (zgodnie z informacją zawartą w dysertacji oraz dołączoną do artykułu) równorzędny udział w jej powstaniu z pierwszym autorem - panią Anną Zakrzewską, jest przeglądem literaturowym (obejmującym 157 pozycji) dotyczącym zastosowania techniki elektroprzędzenia do wytwarzania ochronnych maseczek na twarz. Poza rysem historycznym zaprezentowano przegląd materiałów polimerowych używanych do wytwarzania maseczek ze szczególnym naciskiem na wyspecjalizowane materiały responsywne (zmieniające swoje właściwości pod wpływem bodźców zewnętrznych), umożliwiające wyposażenie masek w pożądane właściwości filtracyjne i bakteriobójcze. Praca stanowi obszerne wprowadzenie, dając Kandydatowi rozległą wiedzę oraz stymulując Go do prowadzenia własnych badań mających na celu opracowanie masek posiadających właściwości antybakteryjne „na żądanie”, uzyskane za pomocą materiałów fotoresponsywnych.

W dalszych trzech publikacjach Kandydat jest pierwszym autorem. Są to artykuły eksperymentalne, przedstawiające badania własne mgr Bayana nad nowoczesnymi systemami dostarczania leków oraz chirurgicznymi maskami na twarz - podstawowym elementem ochrony osobistej przed zakażeniami mikroorganizmami. Elementem spajającym wszystkie zaprezentowane w cyklu badania jest zastosowanie przez Doktoranta metody elektroprzędzenia

jako podstawowej techniki użytej do wytwarzania zaproponowanych, nowatorskich materiałów.

Realizacja celu rozprawy

Osobisty wkład Kandydata w powstanie poszczególnych publikacji został określony w dołączonych oświadczeniach (podpisanych przez Kandydata i Jego Promotora) oraz w szczegółowo omówionych zadaniach przedstawionych na stronach 23 i 24 rozprawy.

Publikacja nr 2: *"Near-infrared light activated core-shell electrospun nanofibers decorated with photoactive plasmonic nanoparticles for on-demand smart drug delivery applications."* autorstwa Kandydata oraz 7 współautorów ukazała się w Journal of Polymer Science w 2023 r. Powstała ona we współpracy z prof. Alexandrem L. Yarinem z Uniwersytetu Illinois z Chicago, Stany Zjednoczone.

W pracy tej, po raz pierwszy postanowiono wykorzystać substancję światłoczułą w postaci plazmonicznych nanorurek złota do konstrukcji inteligentnego systemu dozowania leku, zakładając, że wzrost temperatury włókien zwiększy wydajność zaprojektowanego układu.

W tym celu mgr Bayan opracował metodę jednoczesnego elektroprzędzenia podwójnej nici typu rdzeń/otoczka (*ang. core/shell*) i elektrostatycznego nanoszenia zawiesziny nanocząstek złota w wodnym roztworze etanolu na zewnętrzną powierzchnię wytwarzanych włókien, skutecznie rozwiązując problemy techniczne i proceduralne związane z opracowaniem tej innowacyjnej techniki. Do wytworzenia nanowłókien użyto opracowanego przez grupę prof. Yarina układu polimerowego stosując alkohol poliwinylowy (PVA) - jako polimer hydrofilowy (rdzeń) i kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA) jako hydrofobowa, nierozpuszczalna w wodzie otoczka. Badania struktury wytworzonych nanowłókien przeprowadzone metodami elektronowej mikroskopii skaningowej (SEM) i spektroskopii w podczerwieni metodą ATR-FTIR potwierdziły warstwową budowę nanowłókien. Badania termicznej odpowiedzi włókien na naświetlanie promieniowaniem z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR) wykazały istotny wzrost temperatury włókien. W efekcie Kandydat wytworzył kompaktowe nanowłókniny o właściwościach fototermicznych, które po naświetleniu promieniowaniem NIR, „na żądanie” zwiększały uwalnianie enkapsulowanych w ich wnętrzu modelowych cząsteczek leku (rodamina B). Prace Doktoranta obejmowały także opracowanie warunków elektroprzędzenia litych włókien wytworzonych z polimeru rdzenia oraz z polimeru otoczki o tej samej grubości (a więc i powierzchni) co włókna typu core/shell, co umożliwiło Mu bezpośrednie porównanie profili uwalniania substancji modelowej ze wszystkich trzech typów włókien.

W dalszych badaniach, przeprowadzonych przez współautorów potwierdzono strukturę rdzeń/otoczki wytworzonych włókien, obecność nanorurek złota na powierzchni włókien oraz stwierdzono ich biogodność w badaniach cytotoksyczności na komórkach mysich fibroblastów L-929.

Przeprowadzone badania udowadniają prawdziwość przyjętego założenia i potwierdzają przydatność zaproponowanego materiału do konstrukcji inteligentnych systemów dozowania leków „na żądanie”.

Wkład mgr Bayana w powstanie tego artykułu oceniam na dominujący, również w świetle Jego deklarowanego udziału w pisaniu manuskryptu.

Pozostałe dwie publikacje cyklu poświęcone są nieco innej tematyce jaką jest ochrona osobista przed zanieczyszczeniami oraz mikroorganizmami obecnymi w powietrzu i dotyczą

projektowania maseczek na twarz o właściwościach bakteriobójczych i samooczyszczających się. Pierwsza z nich pt: *"Engineering surgical face masks with photothermal and photodynamic plasmonic nanostructures for enhancing filtration and on-demand pathogen eradication"* ukazała się w 2024 r w Biomaterials Science. Kandydat jest tu pierwszym spośród 14 autor, a powstała ona we współpracy z zagranicznymi ośrodkami naukowymi z Estonii, Chin i Włoch.

W pracy tej postanowiono wykorzystać fototermiczne i fotodynamiczne właściwości nanorurek złota do dezaktywacji bakterii osiadłych na maseczkach chirurgicznych. Do zadań Doktoranta należało opracowanie i optymalizacja metody nanoszenia powłoki z nanowłókniny bezpośrednio na zewnętrzną warstwę komercyjnych masek chirurgicznych. W tym celu także wykorzystał On technikę elektroprzędzenia używając poliakrylonitrylu (PAN) jako materiału włókniny. Na tak przygotowaną powierzchnię metodą elektrospreju nanosił następnie warstwę plazmonicznych nanorurek złota. Aby zapobiec „ucieczce” napylnych nanocząstek z powierzchni maski wykorzystano metodę „kanapki”, przykrywając nanorurki złota kolejną warstwą nanowłókniny. Morfologia wytworzonej nanowłókniny i jej ściśle przyleganie do natywnej powierzchni maski zostały potwierdzone za pomocą mikroskopii SEM. Następnie Kandydat zaprojektował i przeprowadził badania termowizyjne, za pomocą których potwierdził właściwości fototermiczne wytworzonych powierzchni w badaniach z użyciem światła NIR. Mgr Bayan zoptymalizował trzy istotne z punktu widzenia skuteczności sterylizacyjnej masek parametry: moc lasera użytego do wytworzenia wybranej temperatury powierzchni maski (113,2⁰C), czas naświetlania warstwy aktywnej oraz liczbę napylnych nanocząstek złota. W badaniach tych udowodnił także termiczne bezpieczeństwo stosowania modyfikowanych masek – podgrzanie zewnętrznej powierzchni maski do temperatury nieco powyżej 60⁰C pozostawiało warstwę wewnętrzną maseczki o temperaturze poniżej 30⁰C.

W dalszych badaniach przeprowadzonych przez współautorów publikacji udowodniono zdolność modyfikowanych masek do indukowania reaktywnych form tlenu, biogodność masek w aspekcie cytotoksyczności (na linii komórkowej nerki chomika BHK-21), polepszenie ich właściwości filtracyjnych w stosunku do bakterii oraz pyłów frakcji PM₀₋₃, a także ich zdolność do zabijania bakterii gronkowca złocistego osadzonych na powierzchni modyfikowanych masek.

Wkład mgr Bayana w powstanie tego artykułu oceniam na kluczowy. Poza pracą eksperymentalną aktywnie uczestniczył także w pisaniu publikacji, przygotowaniu rysunków i odpowiedzi dla recenzentów.

Ostatnia publikacja z cyklu jest zatytułowana: *"Solar-to-NIR Light Activable PHBV/ICG Nanofiber-Based Face Masks with On-Demand Combined Photothermal and Photodynamic Antibacterial Properties"* i ukazała się także w 2024 r. w wysoko punktowanym czasopiśmie Advanced Materials Technologies. Powstała ona we współpracy z ośrodkami naukowymi z Chin i Włoch. Kandydat jest pierwszym spośród 13 autorów.

W pracy tej kontynuowano badania nad maseczkami na twarz posiadającymi właściwości fototermiczne i fotodynamiczne. Jednakże, z uwagi na potencjalną szkodliwość zawartych w uprzednio opracowanych maskach nanocząstek złota postanowiono zastąpić je substancją organiczną o podobnych właściwościach, dobrze mieszającą się z roztworem przedzonego polimeru. Wybór padł na zieleń indocyjaninową (ICG), która jako związek fluorescencyjny ulega wzbudzeniu po naświetleniu światłem w zakresie bliskiej podczerwieni. Korzystając z już zdobytej wiedzy i umiejętności Kandydat wytworzył na zewnętrznej powierzchni komercyjnych masek chirurgicznych warstwę nanowłóknin z poli(3-hydroksymaślanu-co-3-hydroksywalerianu) wzbogaconego czterema różnymi stężeniami ICG. Następnie przeprowadził badania obejmujące analizę mikroskopową (SEM) i fizyko-chemiczną morfologii wytworzonych warstw, potwierdzając zmianę struktury maski poprzez wplecenie w nią nanocienkich włókien z PHBV. Badania spektroskopowe, obejmujące

spektroskopię UV-Vis oraz ATR-FTIR wytworzonych nanowłóknin potwierdziły obecność nanoszonego polimeru oraz domieszkowanego ICG.

Ponadto Kandydat przeprowadził badania funkcjonalności wytworzonych powłok takie jak: badanie hydrofilowości modyfikowanych i niemodyfikowanych włóknin poprzez pomiar kąta zwilżalności, klasyczne badania mechaniczne wytworzonych nanowłóknin obejmujące analizę porównawczą próbek o różnej zawartości IGE, badania szybkości transmisji pary wodnej przez maskę modyfikowaną podwójną warstwą nanowłókniny oraz pomiary fototermicznej reakcji modyfikowanych masek zarówno na światło NIR (o długości fali 808 nm) jak i słoneczne, stwierdzając podniesienie temperatury do 67°C i 64°C odpowiednio. Badania fototermiczne objęły także eksperymenty cykliczne, które Doktorant zaprojektował w celu oceny odporności wytworzonych nanowłóknin na stres termiczny. Dowiodły one stabilności i trwałości właściwości fototermicznych modyfikowanych masek gwarantując równomierny rozkład ciepła, konieczny z punktu widzenia możliwości ich wielokrotnego stosowania.

Dalsze badania funkcjonalne modyfikowanych masek, przeprowadzone przez współautorów dowiodły zdolności napromieniowanych nanowłóknin PHBV/ICG do indukcji reaktywnych form tlenu co w połączeniu z jednoczesnym wzrostem temperatury na powierzchni modyfikowane maski spowodowało dezaktywację testowych bakterii *Escherichia coli* i gronkowca złocistego.

W ten sposób udowodniono przydatność zaproponowanej modyfikacji do wytwarzania maseczek na twarz o założonych właściwościach bakteriobójczych i samo sterylizacyjnych.

Wkład mgr Bayana w powstanie tego artykułu oceniam na dominujący. Jest On wykonawcą większości przeprowadzonych prac badawczych, uczestniczył w projektowaniu badań oraz pisaniu publikacji, przygotowaniu rysunków i odpowiedzi dla recenzentów.

Ocena merytoryczna

Przedstawioną mi do oceny rozprawę oceniam bardzo wysoko. Cel badań, który Kandydat sobie wyznaczył został osiągnięty. Zakres badań zaproponowanych i przeprowadzonych przez mgr Bayana jest szeroki i obejmuje wiele zagadnień z zakresu inżynierii materiałowej. Przeprowadzenie opisanych badań wymagało od Niego przede wszystkim opanowania zaawansowanych technologii takich jak elektrostatyczne rozpylanie oraz przedzielenie roztworów polimerów w układach: jednodyszowych, wielodyszowych oraz w skomplikowanym i bardzo trudnym do pracy układzie dwudyszowym współosiowym. Dodatkowo, do wytworzenia każdego z prezentowanych konstruktów użyto innego układu polimer/rozpuszczalnik, co dowodząc dobrej orientacji Doktoranta w chemii polimerów. Analizując właściwości wytworzonych modyfikowanych materiałów Kandydat wykazał się także umiejętnością pracy z zaawansowanymi metodami badawczymi takimi jak mikroskopia SEM, spektroskopia UV-Vis i ATR-FTIR, termometria i inne.

Do szczególnie ważnych, innowacyjnych osiągnięć Doktoranta zaliczam:

- zastosowanie technik elektroprzędzenia i elektrorozpylania w celu zwiększenia funkcjonalności maseczek na twarz,
- opracowanie światłoczułych nośników leków, uwalniających „na żądanie” zwiększone dawki leków,
- opracowanie zmodyfikowanych warstw nanowłóknin łączących właściwości fototermiczne i fotodynamiczne gwarantujących skuteczną sterylizację maseczek po naświetleniu ich światłem słonecznym i NIR.

Bardzo dobry poziom naukowy zaprezentowanych przez Kandydata prac znajduje swoje odbicie w wysokiej jakości czasopiśmie, w których prezentowane prace zostały opublikowane.

Uwagi szczegółowe i pytania

Moje uwagi krytyczne dotyczą formy oddanej mi do oceny rozprawy. Uwaga pierwsza dotyczy reprintów publikacji, które zostały zmniejszone, co znacznie zmniejszyło czcionkę czyniąc ją trudną do czytania, a co gorsza, w dużej mierze uniemożliwiło odczytanie istotnych informacji zawartych na zamieszczonych rysunkach i wykresach. Tę samą wadę ma dołączona do materiałów elektroniczna wersja rozprawy. W praktyce, zapoznanie się z treścią przedstawionych publikacji możliwe było dopiero po pozyskaniu ich elektronicznych wersji ze stron wydawców, a trzeba zaznaczyć, że nie wszystkie z nich są publicznie dostępne.

Druga uwaga ogólna dotyczy tego, że w tekście rozprawy nie zamieszczono materiałów dodatkowych, do których są odniesienia w tekstach wszystkich trzech publikacji eksperymentalnych. Jest to o tyle istotne, że materiały te w głównej mierze odnoszą się do badań osobiście wykonanych przez Kandydata.

Poza tym mam kilka uwag szczegółowych:

- rys. 7 (str. 19) nie prezentuje systemu elektroprądzenia współosiowego jak to jest w podpisie a system mieszany: współosiowy z jednoczesnym elektro-rozpraszaniem zawiesziny nanorurek złota,
- użycie pierwszej osoby liczby mnogiej: „my” w opisie badań przeprowadzonych w poszczególnych publikacjach znacznie utrudnia wyodrębnienie osobistego wkładu Kandydata w przeprowadzone i opisane w publikacji badania,
- bibliografia, w której odnośniki literaturowe nie zawierają tytułów publikacji utrudnia recenzentowi zorientowanie się w trafności jej doboru.
- niespójny układ pracy: kolejność publikacji zamieszczona na str. 25 jest zgodna z kolejnością ich krótkiego omawiania (str. 27-36), ale niezgodna z kolejnością umieszczenia reprintów publikacji w rozprawie - publikacja dotycząca systemu dozowania leków będąca pierwszą publikacją eksperymentalną w wykazie znalazła się na końcu rozprawy.
- bezpodstawne sformułowanie niektórych wniosków, na przykład, w pracy nie udowodniono że powłoka z PLGA chroni enkapsulowany wewnątrz lek, gdyż nie badano prawdziwych leków a jedynie substancję modelową. Podobnie jak nie udowodniono, że opracowane modyfikowane maseczki dezaktywują wirusy, gdyż takich badań nie przeprowadzano.

Pytania do wyjaśnienia w czasie obrony:

- dlaczego w opisie rys. 3 w publikacji dotyczącej systemów dostarczania leków przedstawiającym wyniki badań kalorymetrii skaningowej znalazła się informacja o tym, że widoczny jest „egzotermiczny pik związany z topnieniem polimerów” skoro wiadomo, że proces topnienia jest procesem endogennym – pochłaniającym ciepło?
- czy właściwości fotodynamiczne nanorurek złota, czyli ich zdolność do indukowania aktywnych form tlenu oraz podniesienie temperatury nanowłókny do 70°C nie będą problemem przy zastosowaniu ich w systemach dostarczania leków?

Wniosek Końcowy

Powyższe uwagi w żadnym stopniu nie wpływają na wysoką wartość rozprawy doktorskiej Doktoranta. Udział Kandydata w opisanych badaniach był bez wątpienia kluczowy. Jego wiedza i umiejętności umożliwiły Mu zaprojektowanie i wytworzenie nowatorskich materiałów o istotnych z punktu widzenia postulowanych biomedycznych zastosowań właściwościach, otwierając nowy rozdział w badaniach nad maseczkami ochronnymi i inteligentnymi systemami dozowania leków.

W mojej ocenie praca ta wnosi istotny wkład w rozwój dyscypliny inżynieria materiałowa. Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Mohammada Ali Haghighat Bayana zatytułowana: „Stimuli-Responsive Polymer Nanomaterials for Biomedical Applications” spełnia wszystkie kryteria stawiane przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2023, poz. 742 z późn. zm.). Wnoszę zatem o jej przyjęcie oraz dopuszczenie mgr inż. Mohammada Ali Haghighat Bayana do dalszych etapów postępowania doktorskiego.



