

## RECENZJA

### Rozprawy doktorskiej mgr inż. Oliwii Jeznach

Recenzja została opracowana na zlecenie Rady Naukowej Instytutu Podstawowych Problemów Techniki PAN z dn. 25.04.2024r. przesłanej przez prof. Z. Ranachowskiego sekretarza RN IPPT PAN.

#### Forma rozprawy, zakres merytoryczny, tezy i charakter pracy.

Rozprawa ma formę cyklu czterech artykułów angielskojęzycznych opublikowanych w czasopismach międzynarodowych, poprzedzonych wprowadzeniem w języku polskim i składającym się z następujących elementów: Krótkiego wstępu, streszczenia (również po angielsku), prezentacji celu pracy, hipotez badawczych, omówienia użytych materiałów i metod, omówienia artykułów wchodzących w cykl publikacji, podsumowania i wniosków, wyliczenie wkładu własnego doktorantki oraz spisu literatury. Ostatnim 10 rozdziałem są kopie wszystkich czterech artykułów.

Doktorantka wymienia jako cele pracy cztery punkty:

- 1) porównanie przebiegu reakcji aminolizy dla submikronowych włókien i folii poliestrowych z uwzględnieniem efektywności przyłączania grup aminowych oraz wpływu reakcji na zmiany stopnia krystaliczności, właściwości mechaniczne i zwilżalność włókien i folii,
- 2) określenie wpływu budowy chemicznej włókien z poliestrów alifatycznych na efektywność aminolizy oraz optymalizacja parametrów reakcji aminolizy prowadzonej na submikronowych włóknach poliestrowych tak, aby uzyskać poprawę odpowiedzi komórkowej bez obniżania właściwości mechanicznych i zmiany morfologii włókien,
- 3) wykazanie wpływu efektywności aminolizy na ilość przyłączonej żelatyny do powierzchni poliestrowych włókien i ocena wpływu tej ilości na odpowiedź komórkową oraz wpływu warunków przyłączania na właściwości mechaniczne włókien,
- 4) porównanie opracowanej metody przyłączania żelatyny z dwoma innymi metodami, opartymi na hydrolizie oraz obróbce plazmą tlenową.

Jako hipotezy badawcze Doktorantka przedstawia dwa stwierdzenia:

*Specyfika struktury submikronowych włókien formowanych metodą elektroprzędzenia determinuje przebieg i efektywność procesu aminolizy inny niż w przypadku folii poliestrowych. Dodatkowo, zróżnicowanie budowy chemicznej poliestrów wpływa na przebieg aminolizy.*

*Mimo to, możliwy jest taki dobór warunków aminolizy, który prowadzi do odpowiedniego stężenia grup aminowych na powierzchni włókien, warunkujących przyłączenie żelatyny w stężeniu zapewniającym poprawę odpowiedzi komórkowej, pozwalając na zachowanie morfologii włókien i ich wytrzymałości mechanicznej.*



## **Część teoretyczna rozprawy – analiza literatury i aktualnego stanu wiedzy.**

Wstęp omawiający wprowadzenie do tematyki rozprawy jest bardzo skromny i zawiera jedynie 36 cytowanych odnośników. Natomiast wada ta jest zdecydowanie wyrównana w wstępami do artykułów oryginalnych stanowiących zasadniczą część pracy. Praca dotyczy inżynierii tkankowej a w szczególności wykorzystanie biodegradowalnych poliestrów i ko-poliestrów. Doktorantka wykonała krytyczną analizę literatury i na tej podstawie zidentyfikowała problemy które do tej pory nie zostały wyjaśnione a opisane w literaturze w sposób jednoznacznie satysfakcjonujący. Obiektem przeprowadzonych badań były poliestrowe włókna otrzymywane w metodzie elektroprzędzenia. Jest to metoda dobrze znana. Nanowłókna poliestrowe wykazują szereg korzystnych właściwości – są biokompatybilne, biodegradowalne i łatwo przetwarzalne za pomocą różnych technik. Formowane z nich metodą elektroprzędzenia podłoża komórkowe imitują układ włókien macierzy pozakomórkowej. Jednak równocześnie, podłoża te są hydrofobowe i nieaktywne biologicznie, co jest niekorzystne z perspektywy adhezji i proliferacji komórek na podłożu. Natomiast brak jest jak dotąd opisów biofunkcjonalizacji takich włókien za pomocą żelatyny –co bardzo trafnie wychwyciła Doktorantka. Opierając się o analizę literatury wybrała Ona jako metodę badawczą aminolizę włókien wybranych poliestrów jako sposób aktywacji powierzchni włókien. Do tak aktywowanej powierzchni planowała przyłączyć żelatynę jako czynnik biofunkcjonalizujący nanowłókna. Tu trzeba wyraźnie zaznaczyć, że obrana sekwencja reakcji jest bardzo dobrze znana w chemii organicznej. Nie jest to zarzut ale stwierdzenie obrazujące stan faktyczny.

## **Część eksperymentalna – ocena realizowanych zagadnień i metod – poprawność wyciągniętych wniosków, sposób przedstawiania wyników i formowania wniosków**

W pierwszej publikacji przeprowadzono badania aminolizy przeprowadzono zarówno na włókninie jak i na foliach wylanych z tego samego roztworu. Porównanie wyników dla obydwóch form wytworzonych membran było ze wszech miar celowe. Jest rzeczą często ignorowaną, że różne formy produktów wytworzonych z polimeru otrzymywane nawet za pomocą tej samej metody (tu: inwersja faz przez odparowanie) mogą się w sposób istotny różnić właściwościami. Za pomocą spektroskopii ATR-FTIR potwierdzono jakościowo zajście reakcji aminolizy. Metoda WAXS pozwoliła ocenić zmiany stopnia krystaliczności badanych materiałów. Zaobserwowano tendencję do spadku naprężenia przy zerwaniu po funkcjonalizacji wynoszące 7%, w przypadku folii PCL jak i 78%, jak w przypadku folii PLCL78%, jak w przypadku folii PLCL. Bardzo ciekawą jest obserwacja, że w przypadku włókniny PCL nie zaobserwowano aminolizy!

W publikacji drugiej zbadano wpływ aminolizy na właściwości materiałowe i odpowiedź komórek i w oparciu o uzyskane wyniki dobrano najlepsze warunki funkcjonalizacji elektroprzędzonych włókien. Za pomocą analizy XPS oceniano zawartość azotu w próbkach po aminolizie. Chromatografia GPC pozwoliła ustalić zmiany mas cząsteczkowych w polimerach poddanych aminolizie. Do oceny morfologii włókien wykorzystano mikroskopię SEM. W opisie brak jest istotnej informacji o grubości warstwy przewodnika jakim pokryto włókna przed obrazowaniem SEM. Badanie za pomocą metody WAXS pozwoliło na ocenę krystaliczności. Wzrastającej po procesie aminolizy. Natomiast najciekawsze są w tej pracy badania z komórkami fibroblastami linii L929. Obserwacje wskazywały, że po aminolizie widoczna była poprawa morfologii fibroblastów (większe rozplaszczanie) w porównaniu z próbkami kontrolnymi i widoczna filopodia świadcząca o poprawie interakcji komórek z materiałem wszystkich próbek. Badania *in vitro* z użyciem



komórek linii MG-63 wykazały większe rozplaszczanie komórek dla próbek PCL i PLCL w porównaniu do próbek wyjściowych, natomiast dla próbki PLLA obserwowano pogorszenie morfologii komórek. Wyniki testu aktywności metabolicznej komórek PrestoBlue™ nie korespondowały z obserwacjami morfologii komórek. Jest to w pewnej mierze zaskakująca obserwacja.

W trzeciej publikacji przedstawiono porównanie procesu przyłączania żelatyny do powierzchni funkcjonalizowanych włókien otrzymanych z PCL, PLCL i PLLA. Wykorzystano włókna o dwóch różnych stężeniach przyłączonych grup aminowych aby ocenić ich wpływ na efektywność wiązania żelatyny. Jako metodę wiązania z grupami aminowymi zastosowano standardową metodę reakcji z aldehydem glutarowym. Stwierdzono efektywne przyłączenie żelatyny do włókien poliestrów (metoda BCA) i brak zmian morfologii włókien (za pomocą SEM). Zaobserwowano, że przy małych stężeniach grup aminowych (poniżej  $5 \cdot 10^{-8}$  mol/mg) główne znaczenie ma adsorpcja fizyczna a dopiero przy wyższych stężeniach większą rolę odgrywa wiązanie chemiczne. Jest to bardzo istotne stwierdzenie. Analizy wykonano za pomocą spektroskopii XPS. Stwierdzono również, że warstwy przyłączonej żelatyny są grubości mniejszej od głębokości wnikania wiązki XPS, a więc 10 nm. Na wszystkich próbkach z przyłączoną żelatyną zaobserwowano poprawę morfologii komórek linii L929. Obserwacje za pomocą SEM wskazywały na dużo większe rozplaszczanie komórek na wszystkich próbkach z przyłączoną żelatyną, przy czym w przypadku włókien PCL i PLCL rozplaszczanie było wyraźniejsze dla próbek modyfikowanych chemicznie. Zbadano również aktywność metaboliczną komórek osadzonych na sfunkcjonalizowanych włókninach. Wyniki aktywności metabolicznej komórek po 5 dniach hodowli wskazywały na stopniowy wzrost od próbki z fizycznie przyłączoną żelatyną do próbki o wyższym stężeniu grup aminowych dla włókniny PCL. W przypadku PLCL i PLLA nie zaobserwowano wzrostu aktywności metabolicznej dla próbek z przyłączoną żelatyną. Zarówno obserwacje mikroskopowe jak i wyniki badań aktywności metabolicznej wskazują na większy wpływ modyfikacji chemicznej na poprawę odpowiedzi komórkowej.

W czwartej publikacji porównano trzy metody przyłączania żelatyny do powierzchni włókien PLCL, ze szczególnym uwzględnieniem odpowiedzi komórek linii L929. Metody te oparte były na aminolizie, hydrolizie zasadowej z użyciem NaOH i obróbce niskotemperaturową plazmą tlenową. Zaobserwowano różny wpływ każdej z metod funkcjonalizacji na morfologię włókien, świadczący o odmiennym mechanizmie reakcji. W przypadku hydrolizy widoczne było „łuszczenie się” powierzchni włókien, a dla najwyższych stężeń roztworu NaOH i czasu reakcji - także ich sklejanie. Jak wskazano we wcześniejszej pracy z cyklu, aminoliza przy zastosowaniu wysokich parametrów reakcji prowadzi z kolei do pękania włókien. Dla włókien funkcjonalizowanych za pomocą obróbki plazmą przy zastosowanych parametrach nie uwidocznilo zmian morfologii. Stwierdzono że zarówno aminoliza jak i obróbka plazmą prowadzą do spadku masy cząsteczkowej polimeru, przy czym dla wybranych warunków funkcjonalizacji spadki były większe w przypadku aminolizy. Wskazuje to na wpływ aminolizy i obróbki plazmą na strukturę chemiczną całej objętości materiału, nie tylko jego powierzchni. Natomiast wyniki chromatografii i SEM pozwalają stwierdzić, że działanie hydrolityczne NaOH jest jedynie powierzchniowe.

W drugiej części tej pracy zbadano przyłączanie żelatyny do powierzchni funkcjonalizowanych próbek. Wyniki spektroskopii ATR-FTIR wykazały obecność żelatyny na powierzchni włókien modyfikowanych każdą z trzech metod. Ustalono warunki wszystkich metod funkcjonalizacji zapewniające wysoką stabilność przyłączonej warstwy żelatyny. Na podstawie badań *in vitro* z udziałem fibroblastów linii L929 wykazano brak cytotoksyczności dla wszystkich próbek z przyłączoną żelatyną. Nie zaobserwowano jednak



jednoznacznego trendu w zmianach aktywności metabolicznej komórek hodowanych na modyfikowanych próbkach. Po 3 dniach hodowli, największy wzrost aktywności metabolicznej komórek w stosunku do próbki kontrolnej wykazano dla jednej z próbek poddanych obróbce plazmą i próbki poddanej hydrolizie w najbardziej agresywnych warunkach. Obserwacje za pomocą SEM i mikroskopii fluorescencyjnej wykazały poprawę morfologii komórek linii L929 dla wszystkich próbek z przyłączoną żelatyną, przy czym próbki modyfikowane w najbardziej intensywnych warunkach obróbki plazmą i hydrolizą, wykazywały najbardziej rozwinięte filopodia i lamellipodia, wskazujące na jej bardzo dobry kontakt z danym podłożem. Na podstawie uzyskanych wyników należy stwierdzić, że każda z badanych metod może prowadzić do poprawy odpowiedzi komórkowej, przy czym kluczowym jest dobór parametrów modyfikacji ze względu na zmiany właściwości podłoża takie jak morfologia włóknin, właściwości mechaniczne także stabilność przyłączonej warstwy żelatyny.

Podsumowując tą część rozprawy uważam, że przeprowadzone badania zostały wykonane w pełni celowo i zgodnie z obecnymi standardami badań naukowych. Dobór metod badawczych był celowy i wynikał ze specyfiki badanych materiałów. Opisy i dyskusja nie zawierały niepotrzebnych dłużyzn. Wnioski oparte o wyniki badań eksperymentalnych zostały sformułowane ostrożnie precyzyjnie.

### **Oryginalność rozprawy, aktualność tematyki status uzyskanych wyników w odniesieniu do stanu wiedzy**

Jednym z kierunków poszukiwań środków pozwalających przywrócić lub zastąpić utracone funkcje organizmu jest inżynieria komórkowa. Jest to obecnie dziedzina intensywnie rozwijana, ale mimo to należy stwierdzić, że jest to jeszcze całkiem nowa dziedzina w której jest jeszcze bardzo wiele do zrobienia. Z tego punktu widzenia wybór celu badawczego jest trafny i uzyskane wyniki mają walor oryginalności.

Pierwszym celem jaki doktorantka postawiła sobie było porównanie przebiegu aminolizy na elektroprzędzonych włóknach oraz folii płaskiej otrzymanej z tego samego roztworu. Było to bardzo trafne zamierzenie, ponieważ otrzymane dwoma różnymi metodami technicznymi materiały bardzo różnią się od siebie właściwościami. Dotyczy to zarówno morfologii samego materiału jak i powierzchni właściwej. Przeprowadzenie systematycznego porównania wyników aminolizy w zależności od warunków reakcji, wypełnia lukę w wiedzy dotyczącej tej reakcji na włóknach z poliestrów alifatycznych. Jest to tym istotniejsze, że dotyczy aż trzech typów materiałów poliestrowych a mianowicie PLA, PCL i ko-PLCL. Ciekawym spostrzeżeniem było, że nie w każdych warunkach przebiega aminoliza PCL, co było trochę zaskakujące ale jednocześnie bardzo ciekawe..

W dalszej części Doktorantka wykazała, że podczas wiązania żelatyny jako środka funkcjonalizującego włókna poliestrowe z wprowadzonymi do nich grupami aminowymi zachodzi zarówno wiązanie chemiczne jak adsorpcja na i we włóknach. Określiła stężenie graniczne grup aminowych dla którego zaczyna przeważać wiązanie chemiczne jest nową i bardzo wartościową informacją. Wykazała, że fizyczna adsorpcja nie zapewnia dostatecznie trwałej funkcjonalizacji włókien poliestrowych. Ta obserwacja ma specjalne znaczenie dla włókien z PCL, które nie w każdych warunkach ulegają aminolizie. Cechy nowości ma również systematyczne zbadanie procesu modyfikacji włókien żelatyną, uwzględniające m.in. stabilność warstwy i wpływ na odpowiedź komórek na modyfikację. Biorąc pod uwagę, że tak modyfikowane włókna poliestrowe mogą potencjalnie posłużyć do inplantacji - w perspektywie u ludzi, to wszelkie badania nowych materiałów z użyciem żywych komórek i obserwacje uzyskane w tych badaniach mają bardzo istotne znaczenie poznawcze.



Doktorantka przeprowadziła również funkcjonalizację żelatyną wykorzystując inne metody wiązania żelatyny. Wstępnie poddawała włókna hydrolizie wodnym roztworem wodorotlenku sodu oraz aktywację tlenową plazmą niskotemperaturową, a następnie wiązała żelatynę za pomocą EDC/NHS. Porównanie odpowiedzi komórkowej dla wszystkich trzech metod funkcjonalizacji ma również istotną wartość badawczą.

Podsumowując wnioski z omówienia nowości naukowych oceniam, że praca jako całość ma istotne cechy nowości naukowej i stanowi istotny wkład do badań nad materiałami mogącymi znaleźć zastosowanie w inżynierii komórkowej.

### **Pytania i problemy dyskusyjne dotyczące rozprawy**

Całość pracy została przygotowana bardzo starannie i nie zawiera istotnych błędów edycyjnych czy merytorycznych. Układ jest przejrzysty co bardzo ułatwia lekturę i ocenę pracy. Omówienie wyników uwydatnienie osiągnięć własnych oraz podsumowanie przygotowane zostały bardzo starannie. Pomimo tego znalazłem kilka drobiazgów na które chciałbym zwrócić uwagę+

:

Jak grubą warstwą przewodnika były napyłane próbki do SEM? Tej bardzo istotnej informacji nie znalazłem zarówno w części polskojęzycznej jak i w publikacjach drugiej i trzeciej. Dopiero w czwartej publikacji podano, że próbki napyłono warstwą złota o grubości ok. 10 nm. Przy tak delikatnym materiale jak włókniyny z poliestrów alifatycznych grubość warstwy przewodnika ma zasadnicze znaczenie, bo łatwo można doprowadzić do stanu gdzie obserwujemy przewodnik na stopionym materiale. W związku z tym jaką grubość przewodnika osadzono na próbkach opisanych w artykule 2 i 3?

Doktorantka używa potocznej nazwy „glutaraldehyd”. W pracy doktorskiej powinno się raczej używać pełnej nazwy „aldehyd glutarowy”, a przynajmniej na wstępie należy podać nazwę systematyczną pentano-1,5-diol. Szkoda, że Doktorantka tego zaniedbała.

Co Doktorantka rozumie pod terminem „kruche pękanie włókien”?

Zdając sobie sprawę – jako praktyk - z problemów technicznych chciałbym zapytać: czy została podjęta próba wykonania powiększeń SEM przełamów włókien, a szczególnie włókien pokruszonych? Być może dałoby to dodatkowe ciekawe informacje.

Czy Doktorantka planuje kontynuację prac nad funkcjonalizacją włókien, np. w kopolimerach zawierających glikolid?

### **Wniosek końcowy -wkład rozprawy do nauki.**

Uważam, że rozprawa zawiera wystarczające elementy nowości w dyscyplinie inżynieria materiałowa w związku z tym:

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji **rozprawa doktorska spełnia wymagania Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z 14 marca 2003 roku, Dziennik Ustaw Nr 65, poz. 595 z późn. zm. oraz Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora. Wniosuję o dopuszczenie rozprawy doktorskiej mgr inż. Oliwii Jeznach do publicznej obrony.**

Jednocześnie biorąc pod uwagę cały materiał zawarty w przedstawionej do oceny pracy zwracam się do Rady Naukowej IPPT PAN z wnioskiem o rozważanie nadania wyróżnienia rozprawie doktorskiej mgr inż. Oliwii Jeznach.



