



**AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA**  
**IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE**  
Wydział Inżynierii Metali i Informatyki Przemysłowej  
Katedra Metaloznawstwa i Metalurgii Proszków  
**Electrospun Fibers Group**

**Prof. dr hab. inż. Urszula Stachewicz**  
Tel. +48 12 617 52 30;  
e-mail: [ustachew@agh.edu.pl](mailto:ustachew@agh.edu.pl)  
website: <https://fibers.agh.edu.pl/>

Kraków, 29 czerwca 2024 r.

### **Recenzja**

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Oliwii Jeznach

### **„Modyfikacja powierzchni włókien z biodegradowalnych poliestrów alifatycznych za pomocą reakcji aminolizy i przyłączania żelatyny do zastosowań w inżynierii tkankowej”**

wykonanej w Instytucie Podstawowych Problemów Techniki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, w Samodzielnej Pracowni Polimerów i Biomateriałów pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Pawła Ł. Sajkiewicza i promotora pomocniczego dr inż. Doroty Kołbuk-Konieczny

#### **1. Charakterystyka pracy doktorskiej**

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Oliwii Jeznach zawiera badania nad rusztowaniami otrzymanymi metodą elektroprzędzenia z trzech poliestrów alifatycznych należących do najczęściej wykorzystywanych w inżynierii tkankowej: poli(kaprolaktonu), poli(L-laktydu) i poli(L-laktydu-ko-kaprolaktonu). Celem pracy była ich modyfikacja do poprawy wzrostu komórek na podłożu poprzez wprowadzenie grup aminowych na powierzchnię i przyłączenie żelatyny zawierającej sekwencję peptydową rozpoznawaną przez komórki.

W związku z powyższym, zostały ustalone poniższe cele pracy doktorskiej:

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.

Autorka postawiła następującą hipotezę naukową dotyczącą doboru 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. Poza tym, 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.

Rozprawa doktorska obejmuje 43 strony części opisowej oraz 4 artykuły naukowe. Część opisowa składa się z 8 rozdziałów: wprowadzenie z przeglądem literatury, cele pracy i hipotezę, materiały i metody eksperymentalne, wyniki badań wraz z dyskusją,

streszczenie artykułów naukowych i wnioski oraz bibliografię zawierającą 36 pozycji. Dodatkowo został dołączony do pracy dorobek naukowy kandydatki na doktora w formie CV, wykaz publikacji, raport z badania antyplagiatowego pracy i załącznik opisujący m.in. efekty kształcenia ze studiów doktoranckich oraz opinia promotorów.

Na pracę składają się następujące publikacje:

1. Jeznach O., Kołbuk D., Sajkiewicz P., Aminolysis of various aliphatic polyesters in a form of nanofibers and films, *Polymers*, Vol.11, No.10, pp.1669-1-16, 2019.
2. Jeznach O., Kołbuk D., Marzec M., Bernasik A., Sajkiewicz P., Aminolysis as a surface functionalization method of aliphatic polyester nonwovens: impact on material properties and biological response, *RSC Advances*, Vol.12, No.18, pp.11303-11317, 2022.
3. Jeznach O., Kołbuk D., Reich T., Sajkiewicz P., Immobilization of Gelatin on Fibers for Tissue Engineering Applications: A Comparative Study of Three Aliphatic Polyesters, *Polymers*, Vol.14, No.19, pp.4154-1-21, 2022.
4. Dulnik J., Jeznach O., Sajkiewicz P., A Comparative Study of Three Approaches to Fibre's Surface Functionalization, *Journal of Functional Biomaterials*, Vol.13, No.4, pp.272-1-23, 2022.

Doktorantka umieściła streszczenie pracy w języku angielskim i streszczenie artykułów. Całość pracy bazuje na wyżej wymienionych 4 publikacjach, gdzie są przedstawione wszystkie wyniki badań do doktoratu.

We wstępie zostały opisane użyte materiały, metoda elektroprzędzenia i ogólnie metody charakteryzacji jakie zastosowała w swojej pracy badawczej Doktorantka. Opis obejmuje następujące metody:

- Obrazowanie włókien za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej
- Ocena stężenia przyłączonych grup aminowych i przyłączonej żelatyny
- Ocena struktury molekularnej powierzchni próbek



- Ocena struktury supermolekularnej próbek
- Pomiar zwilżalności i testy degradacji materiałów
- Pomiar zmian mas cząsteczkowych
- Wyznaczenie właściwości mechanicznych
- Ocena stabilności przyłączonej warstwy żelatyny
- Ocena odpowiedzi komórkowej

W mojej ocenie zakres przeglądu literatury we wstępie pracy został dobrany trafnie i rzetelnie przedstawiony, w związku z czym Doktorantka jasno sformułowała cele pracy i zaplanowała badania eksperymentalne. W 4 rozdziale zostały opisane materiały, a w 5 rozdziale wykorzystane metody badań. W części doświadczalnej w rozdziale 6 zostały opisane publikacje składające się na główną część pracy doktorskiej, które zostały już wcześniej wymienione. Na końcu pracy Doktorantka podsumowała wyniki i opisała oryginalny wkład własny w pracę.

## 2. Ocena pracy

Doktorantka podjęła w swojej pracy ciekawą i trudną tematykę związaną z kwestią zachowania aktywności biologicznej cząsteczki białka po przyłączeniu do podłoża komórkowego. Wykorzystano tu metodę fizycznej adsorpcji, która jest łatwiejsza do przeprowadzenia i nie wymaga stosowania agresywnych odczynników chemicznych, jednak może powodować denaturację cząsteczki białka. W takiej postaci białka mogą nie spełniać swojej funkcji biologicznej. Autorka w rozprawie przeprowadziła modyfikację powierzchni składającą się z dwóch etapów, funkcjonalizacji powierzchni poprzez wprowadzenie grup aminowych za pomocą reakcji aminolizy oraz przyłączenia żelatyny jako białka zawierającego sekwencję aminokwasów: arginina-glicyna-kwas asparaginowy, (arginine (R), glycine (G), aspartic acid (D), Arg-Gly-Asp), tzw RGD, która jest odpowiedzialna za wiązanie się z integrzynami, receptorami komórek odpowiedzialnymi za adhezję do podłoża.

Na podstawie przeczytanych artykułów stwierdzam, że badania zostały przeprowadzone w sposób systematyczny i staranny. Mimo że praca składa się z cyklu opublikowanych

artykułów, które zostały poddane procesowi recenzji, chciałabym zwrócić uwagę na kilka punktów do dyskusji, zwłaszcza do prac, w których autorka opisuje swoje wyniki badań.

## **Publikacja 1**

### **Aminolysis of Various Aliphatic Polyesters in a Form of Nanofibers and Films**

1. Ile razy była mierzona i w ilu miejscach grubość próbki do testów mechanicznych? Jaki jest błąd tego typu pomiaru?
2. Czy w obliczeniach maksymalnego naprężenia materiału wzięta była pod uwagę porowatość próbki?
3. Jak obliczany był Moduł Younga dla włóknistych próbek? Brak opisu w metodach.
4. Czy otrzymane włókna były ukierunkowane? Niestety nie ma zdjęć próbek przy użyciu SEM w tej publikacji. Jeśli włókna nie są dobrze ukierunkowane proszę wytłumaczyć jakim błędem obarczone są obliczenia Modułu Younga?
5. Krzywe naprężenie - odkształcenie powinny zostać pokazane w pracy, ponieważ nie są niestety zawarte w publikacji.
6. Czy chropowatość próbki została uwzględniona w pomiarach kąta zwilżania? Niestety Doktorantka nie podaje wielkości średnic otrzymanych włókien a ich morfologii nie można zweryfikować, ponieważ nie ma w publikacji obrazów SEM.

## **Publikacja 2**

### **Aminolysis as a surface functionalization method of aliphatic polyester nonwovens: impact on material properties and biological response**

7. W publikacji 2 nie ma podanych parametrów obrazowania SEM. Parametry obrazowania wpływają na jakość otrzymanych mikrografii i ich późniejszą interpretację. Proszę przynajmniej podać tzw. '*working distance*' i w jaki sposób zastało nałożone pokrycie Au i jego grubość.

8. Brakuje opisu grubości próbek elektroprowadzonych włókien. Jaki jest błąd pomiaru?
9. Jakie rozmiary średnic włókien z PCL i PLCL zostały otrzymane metodą elektroprowadzenia?
10. Brak pokazania reprezentatywnych krzywych naprężenie-odkształcenie rozciągania dla mierzonych próbek.
11. Na *Rysunku 10* brakuje opisu koloru barwienia, długości lasera i co oznacza na zdjęciu z mikroskopii fluorescencyjnej. Czy była obserwowana auto fluorescencja od wyprodukowanych włókien?
12. W metodach napisano „Cells were cultured in an incubator at 40°C in a 5% CO<sub>2</sub>.”, zazwyczaj stosowana temperatura wynosi 37°C, dlaczego jest ona podniesiona w tym doświadczeniu?
13. Czy były zaobserwowane różnice w morfologii komórek L929 i MG63 w zależności od typu i modyfikacji włókien?

### **Publikacja 3**

#### **Immobilization of Gelatin on Fibers for Tissue Engineering Applications: A Comparative Study of Three Aliphatic Polyesters**

14. Jakie wartości napięcia powierzchniowego dla wody destylowanej, formamidu i diiodometanu były wzięte do obliczeń napięcia powięźniowego polimerowych filmów przy użyciu modelu Owens, Wendt, Rabel and Kaelble (OWRK)?
15. Na *Rysunku 3a i b* pojawiają się na osiach X przecinki zamiast kropek w adnotacjach liczbowych. Na wykresach zostały przedstawione linie trendu, jednak bez podania ich dopasowania czy też równania.

## Publikacja 4

### A Comparative Study of Three Approaches to Fibre's Surface Functionalization

16. Brak szczegółów odnośnie sprzętu użytego do pokrycia próbek złotem przed obrazowaniem SEM.
17. Na *Rysunek 4* są 2 rodzaje linii: ciągła i przerywana. Do której linii zostały podane parametry  $x_1$ ,  $x_2$  i  $R^2$ ?
18. Czy można wyjaśnić dlaczego włókna pokazane na *Rysunku 5b*) po modyfikacji są krótkie?
19. *Rysunek 14* – brak analizy statystycznej wyników badań in vitro.
20. *Rysunek 15 i 16* brak opisu symboli na zdjęciach SEM.

Dodatkowo ogólne uwagi do pracy:

1. Czy jest Pani pewna że zawsze w procesie elektroprzędzenia wytypuje stożek Taylor, tak jak Pani opisała to w pracy na stronie 18?
2. Metoda FTIR nie daje informacji o własnościach powierzchniowych tak jak Pani to opisała w rozdziale 5.8.4 na stronie 22.
3. Doktorantka napisała na stronie 23 „Grubość każdej z próbek zmierzono za pomocą grubościomierza.” Jaki jest błąd tego pomiaru?

Uwagi o charakterze dyskusyjnym i uwagi redakcyjne zawarte w tej recenzji nie wpływają na pozytywną ocenę pracy. Są one wskazówkami przydanymi w dalszym rozwoju naukowo-badawczym Doktorantki.


### 3. Ocena końcowa pracy

Po zapoznaniu się z pracą doktorską i przeanalizowaniu wyników stwierdzam, że cele badawcze zostały bardzo dobrze opisane i rozważone. Praca składa się z cyklu 4 publikacji, które wykazały że aminoliza przebiega wolniej na włókninach niż na foliach poliestrowych pomimo ich większego rozwinięcia powierzchni w przeliczeniu na masę



materiału. Zastosowanie zbyt agresywnych warunków reakcji aminolizy prowadzi do gwałtownego spadku mas cząsteczkowych wszystkich typów badanych przez Doktorantkę włókien polimerowych, co powoduje ich kruche pękanie i obniżenie właściwości mechanicznych. Dodatkowo przyłączanie żelatyny do poliestrowych włókien za pomocą reakcji aminolizy i sieciowania glutaraldehydem prowadzi do uzyskania większej ilości żelatyny na powierzchni włókien niż w przypadku fizycznej adsorpcji. Zastosowanie łagodnych warunków aminolizy włókien PLCL wraz z przyłączeniem do nich żelatyny za pomocą sieciowania glutaraldehydem pozwala poprawić morfologię fibroblastów na powierzchni włókien. W związku z powyższymi wynikami stwierdzam, że praca ta jest świetnym przykładem interdyscyplinarnych badań obejmujących metody wywarzania rusztowań i ich modyfikacji oraz ich charakteryzacji połączonych z odpowiedziami biologicznymi komórek i powinna zostać wyróżniona.

Praca Pani mgr inż. Oliwii Jeznach „Modyfikacja powierzchni włókien z biodegradowalnych poliestrów alifatycznych za pomocą reakcji aminolizy i przyłączania żelatyny do zastosowań w inżynierii tkankowej” zawiera wartościowe wyniki badań i ich dyskusję. Według mojej opinii praca ta spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim, określone ustawą o stopniach i tytułach naukowych. Wniosuję do Rady Instytutu Podstawowych Problemów Techniki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o przyjęcie rozprawy doktorskiej i o dopuszczenie Pani mgr inż. Oliwii Jeznach do publicznej obrony.

  
Urszula Stachewicz