



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I KOMPOZYTÓW

Prof. dr hab. inż. Elżbieta PAMUŁA
Prodziekan ds. Nauki WIMiC

Kraków, 10 stycznia 2024

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Chytrosz-Wróbel
pt. *"Functionalization of polymeric biomaterial surfaces:
functional groups and bioactive substances"*
zrealizowanej pod kierunkiem
Promotora Prof. dr. hab. Andrzeja Kotarby
i Promotor pomocniczej Dr inż. Moniki Gołdy-Cępy

Recenzja została opracowana na podstawie uchwały
Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego
i zlecenia Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne
Prof. dr. hab. Artura Michalaka z dnia 29 listopada 2023

Wyroby medyczne takie jak stenty przełyku, stosowane w leczeniu paliatywnym pacjentów onkologicznych, nie zawsze spełniają swoją funkcję, co objawia się np. ich zapadaniem się, zarastaniem światła przełyku tkanką nowotworową lub ziarniną, czemu często towarzyszy infekcja bakteryjna. Badania prowadzone przez panią mgr Paulinę Chytrosz-Wróbel skupiające się z jednej strony na opisaniu i zrozumieniu zjawisk jakie zachodzą w stentach przełyku pod wpływem środowiska biologicznego, a z drugiej strony na modyfikacji powierzchni biomateriałów polimerowych w celu nadania im nowych funkcjonalności, aby można było na tej podstawie projektować nowej generacji wyroby medyczne, stanowią odpowiedź na zapotrzebowania środowiska medycznego. Dlatego uważam, że wybór tematyki rozprawy doktorskiej jest nowatorski, trafny i właściwie uzasadniony.



WIMiC

Akademia Górniczo-Hutnicza | Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
Katedra Biomateriałów i Kompozytów

al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, tel. +48 12 617 44 48, fax. +48 12 617 33 71
e-mail: epamula@agh.edu.pl, www.ceramika.agh.edu.pl
Regon: 000001577, NIP: 675 000 19 23

Rozprawa doktorska pani mgr Pauliny Chytrosz-Wróbel została zredagowana w języku angielskim, liczy 153 strony.

Na początku rozprawy znajduje się informacja, że praca opiera się na 5 artykułach opublikowanych w latach 2018-2023 w czasopismach z bazy JCR (*ACS Biomaterials Science & Engineering* – 2 prace, *Applied Surface Science Advances*, *ACS Applied Nano Materials i Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*), w których udział autorski doktorantki jest dominujący (oszacowany przez nią na poziomie 30-50%). Następnie umieszczono wykaz skrótów i symboli, streszczenie w języku angielskim i polskim, oraz spis treści. Po krótkiej przedmowie (1 strona), w której wymieniono zaangażowanie doktorantki w projekty badawcze i zakres pracy następuje rozdział 2 (9 stron), w którym doktorantka zaznaja czytelnika z aktualnym stanem wiedzy na temat zagadnień obejmujących jej rozprawę. Jest tam więc racjonalnie uzasadnione dlaczego biomateriały polimerowe a w szczególności polietyleny, paryleny i poliuretany nadają się do zastosowania w wyrobach medycznych. Następnie doktorantka stwierdza, że modyfikacja powierzchni za pomocą plazmy tlenowej jest techniką, która może wpływać korzystnie na procesy adhezji komórek ssaczych. Dalej skupia się na metodzie sonochemicznej wytwarzania nanocząstek leków i nanoszenia ich na powierzchnię implantów. Potem skrótowo opisuje modele uwalniania leków i ostatecznie przybliży symulacje metodą dynamiki molekularnej. W rozdziale 3 formułuje cel i przedstawia zarys pracy (2 strony), nakreślając główne obszary dotyczące badań nad degradacją polimerów, ich modyfikacją za pomocą plazmy tlenowej i metody sonochemicznej, które nadają polimerom biomedycznym również funkcję terapeutyczną.

W rozdziale 4 (na 11 stronach) opisano materiały i metody eksperymentalne zastosowane w doktoracie z uwzględnieniem metod funkcjonalizacji powierzchni oraz metod badań strukturalnych, powierzchni i symulacji dynamiki molekularnej.

W rozdziale 5 (zajmującym 24 strony), podzielonym na 5 podrozdziałów, dokonano syntetycznego przedstawienia

i omówienia wyników zawartych w 5 artykułach, będących podstawą całej dysertacji.

Rozdział 5.1. opisuje wyniki badań nad degradacją poliuretanowych membran tworzących wyrób medyczny, mianowicie poliuretanowo-nitinolowe samorozprężalne stenty przełyku, stosowane czasowo u pacjentów onkologicznych. Doktorantka przebadła aż 16 takich stentów, które służyły pacjentom przez okres od 31 do 101 dni, a następnie musiały być usunięte m.in. z uwagi na generowane powikłania. Oceniano budowę mikroskrykturalną, właściwości fizykochemiczne i właściwości powierzchni membran poliuretanowych z odzyskanych stentów, oraz porównano z membraną pochodzącą ze stentu bez kontaktu ze środowiskiem biologicznym. Badania wykazały, że membrany poliuretanowe degradują się nie tylko na powierzchni ale i w masie, o czym świadczy obniżenie temperatury topnienia poliuretanu; ciekawe jest, że degradacja jest bardziej zaawansowana w obszarze stentu, który był bliżej żołądka, a więc na którego oddziaływało niższe stężenie kwasów żołądkowych niż na obszar, który znajdował się bliżej gardła. Oprócz wystąpienia rozgałęzionych spękań badania wykazały poprawę zwilżalności membran poliuretanowych. Doktorantka przypisała je procesom degradacji polimeru, ale czy nie może być to wpływ zaadsorbowanych białek, oraz zaadherowanych komórek i innych składników tkankowych na powierzchni? Proszę doktorantkę, już w trakcie publicznej obrony, o przybliżenie jak usuwano fazę organiczną z odzyskanych stentów, oraz czy zdaniem doktorantki metoda ta była w pełni skuteczna? Czy przeprowadzono np. badania XPS aby wykazać, że nie zmienia się zawartość azotu, który może być uważany za marker zaadsorbowanych białek? Zastanowiło mnie również zdanie ze str. 25 (*„The representative image of reference stent polyurethane material is presented in Figure 5.1 A, where the micro- (30-50 μm) and sub-micropores (>10 μm) are observed, with magnesium particles on the top.”*), w którym doktorantka opisuje uzyskane wyniki i interpretuje je jako obecność nanocząstek magnezu na powierzchni membrany poliuretanowej? Czy to na pewno

były nanocząstki magnezu? A może były to nanocząstki jakiegoś związku magnezu, np. tlenku? Czy doktorantka zastanawiała się w jakim celu producenci wprowadzają takie nanocząstki na powierzchnie membran?

W Rozdziale 5.2 doktorantka skupiła się na modyfikacji plazmą tlenową poliuretanu i wykazała, że w zależności od zastosowanych parametrów można kształtować właściwości powierzchni (wprowadzać grupy polarne na powierzchnię lub zmieniać nanotopografię) nie wpływając na właściwości materiału w objętości. Na Rys. 5.4. zestawiała wartości kąta zwilżania wodą próbek poliuretanu modyfikowanych przez różne okresy czasu obróbki plazmą tlenową, przy różnych parametrach mocy generatora jak i ciśnienia tlenu. Bardzo podoba mi się dyskusja uzyskanych wyników i przekonujące mnie wyjaśnienie dlaczego przy najmniejszym ciśnieniu tlenu (0,14 mbar) modyfikacja jest najbardziej skuteczna i zwilżalność jest najmniejsza. Czy doktorantka w dotychczasowych swoich pracach, próbowała zastosować jeszcze niższe ciśnienie tlenu do modyfikacji polimerów, np. 0,10 lub 0,05 mbara? Może w takich warunkach też udałoby się uzyskać podobną zmianę właściwości powierzchniowych? Doktorantka dokonała też analizy XPS próbek po modyfikacji, które – zgodnie z założeniem – wykazały wzrost stężenia tlenowych grup funkcyjnych i spadek kąta zwilżania w porównaniu z próbkami wyjściowymi. Mam tylko jedną uwagę do opisu widm na rys 5.5 w zakresie C_{1s} , gdyż w przypadku poliuretanu przed modyfikacją pik w położeniu ok. 286 eV należało przypisać nie tylko grupom C-O ale również grupom C-N, które występują w łańcuchach poliuretanowych. Bardzo doceniam przeprowadzenie przez doktorantkę systematycznych badań nad stabilnością modyfikacji powierzchni aż przez 28 dni. Są to bardzo wartościowe wyniki, które pokazują też ograniczenia metody modyfikacji plazmą związane z reorganizacją powierzchni w funkcji czasu. Chciałabym dowiedzieć się w jakich warunkach były przechowywane próbki (temperatura, atmosfera, wilgotność, w powietrzu, w wodzie)? W jakich warunkach zdaniem doktorantki, modyfikacja będzie najbardziej stabilna?

W rozdziale 5.3. doktorantka wykazała, że modyfikacja plazmą tlenową może być zastosowana do innych polimerów niż poliuretan, mianowicie do parylenu C i polietylenu HDPE, które różniły się między sobą krystalicznością. Również badała stabilność modyfikacji w funkcji czasu oceniając zwilżalność próbek, ich energię powierzchniową oraz skład chemiczny w nanoskali metodą XPS oraz nanotopografię metodą AFM. Badania wykazały, że metoda modyfikacji plazmą jest skuteczna w tworzeniu tlenowych grup funkcyjnych i zmienia nanotopografię, co może być wykorzystane np. do szczepienia cząsteczek i immobilizacji nanocząstek. Podobnie jak powyżej mam drobną uwagę odnośnie przypisania piku C_{1s} dla polipropylenu i parylenu C, gdyż w publikacji 3 na Rys. 3 zabrakło tam grup C-H w położeniu 284,8 eV, które występują w obu polimerach.

W rozdziale 5.4. opisano wytwarzanie nanocząstek różnych leków (fluorouracylu, gentamycyny, cefuroksymu, gemcytabiny i karbeniciliny) za pomocą metody sonochemicznej oraz przeprowadzono analizy symulujące powstawanie nanocząstek fluorouracylu w obecności pęcherzyków kawitacyjnych w środowisku o różnej zawartości etanolu. Badania za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) i metody śledzenia nanocząstek (NTA) wykazały, że nanocząstki mają wielkość od 30 do 150 nm, chociaż niektóre z nich wykazywały tendencję do aglomeracji. Badania za pomocą spektroskopii w podczerwieni nie wykazały wpływu procesu sonochemicznego na strukturę leków, co jest wynikiem bardzo obiecującym.

Wyniki opisane przez doktorantkę w rozdziałach 5.1-5.4, pozwoliły jej na zaproponowanie oryginalnej metody modyfikacji powierzchni poliuretanu za pomocą plazmy tlenowej, która stwarza odpowiednie warunki do immobilizacji wytwarzanych *in situ* metodą sonochemiczną nanocząstek leków, co zostało opisane w rozdziale 5.5. Badania za pomocą spektroskopii w podczerwieni dowiodły, że dochodzi do immobilizacji leków na powierzchni w czasie procesu sonochemicznego. Badania and uwalnianiem leków z parylenu C wykazały, że w zależności od rodzaju leku obserwuje się albo ich

nagły wyrzut, jak w przypadku fluorouracylu, albo ich przedłużone, jednorodne uwalnianie, jak w przypadku tetracykliny. Czy doktorantka wykonywała badania nanoszenia antybiotyków i cytostatyków na powierzchnię poliuretanu i oceniała ich stabilność, np. w funkcji czasu przechowywania, albo może planuje wykonanie takich badań w przyszłości? Badania takie pozwoliłyby na praktyczne zastosowanie w przyszłości tak zmodyfikowanych stentów przełyku u pacjentów onkologicznych.

Rozdział 6 Podsumowanie (2 strony) i rozdział 7 Wnioski (1 strona) zostały bardzo dobrze zredagowane i nie mam do nich zastrzeżeń. Rozdział 8 zawiera spis 112 pozycji literaturowych, po czym w aneksie załączono 5 artykułów, na których opiera się praca oraz oświadczenia współautorów opisujące ich wkład merytoryczny i procentowy.

Chciałabym podkreślić, że dysertacja doktorska pani mgr Pauliny Chytrosz-Wróbel pt. *"Functionalization of polymeric biomaterial surfaces: functional groups and bioactive substances"* spełnia kryteria stawiane kandydatom do stopnia doktora w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn.zm.). Na wymienione niewielkie niedociągnięcia, np. dotyczące przypisania widm XPS, zwróciłam uwagę z racji pełnienia funkcji recenzentki, aby doktorantka nie powielala ich w przyszłości w kolejnych swoich pracach. Nie umniejszają one jednak mojej bardzo wysokiej oceny merytorycznej recenzowanej pracy. Pozostałe uwagi i pytania są zaproszeniem do dyskusji naukowej w trakcie publicznej obrony. Dlatego wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej oraz dopuszczenie pani mgr Pauliny Chytrosz-Wróbel do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Ponadto uważam, że pracę doktorską cechuje bardzo wysoki poziom naukowy, o czym świadczą: 1) wykorzystanie nowatorskich technik wytwarzania i modyfikacji biomateriałów, które nadają im dodatkową funkcjonalność, 2) wykorzystanie zaawansowanych technik badawczych, 3) klarowne przedstawienie i dyskusja wyników, oraz 4) wyciąganie wniosków mających solidne poparcie w danych

eksperymentalnych. Na podkreślenie zasługuje też, że opisane w rozprawie wyniki zostały już opublikowane w prestiżowych czasopismach o dużym współczynniku oddziaływania, co oznacza, że już przeszły wnikliwy proces recenzji i zdobyły uznanie środowiska naukowego. W czterech artykułach doktorantka jest pierwszą autorką. Kandydatka do stopnia doktora jest współautorką jeszcze kolejnych 3 publikacji w czasopismach z bazy JCR. Ponadto prezentowała wyniki swoich badań aż na 13 konferencjach naukowych. Doktorantka prowadziła badania nie tylko na macierzystym Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, ale również w Akademii Nauk Republiki Czeskiej i na Uniwersytecie w Helsinkach. Pracowała jako wykonawca projektach NCN Sonata i WAVE-UNISONO. Pani mgr Paulina Chytrosz-Wróbel wykazuje się wyróżniającą aktywnością naukową i może pochwalić się bardzo dobrym dorobkiem, jak na ten etap rozwoju naukowego.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że praca doktorska mgr Pauliny Chytrosz-Wróbel zasługuje na wyróżnienie.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'E. Permuta', is located in the lower right quadrant of the page.