

dr hab. inż. Witold Walke, prof. PŚ
Katedra Biomateriałów
i Inżynierii Wyrobów Medycznych
POLITECHNIKA ŚLĄSKA
Wydział Inżynierii Biomedycznej
ul. Roosevelta 40
41-800 Zabrze

Zabrze, 17.05.2021r.

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr inż. Gabrieli Imbir
pt.: „Biomechanical and morphological effect on the acellular animal origin
tissue caused by the surface functionalization”
wykonanej pod kierunkiem
dr hab. Romana Majora, prof. PAN
(promotor pomocniczy: dr Aldona Mzyk)

Recenzja rozprawy doktorskiej została opracowana na podstawie uchwały Rady Naukowej Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej im. A. Krupkowskiego PAN oraz zlecenia Dyrektora Instytutu dr hab. Joanny Wojewody-Budka, prof. PAN z dnia 18.03.2021r. (pismo IMIM/DP/83/2020) z uwzględnieniem kryteriów określonych w Ustawie z dn. 14.03.2003 o stopniach naukowych oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65. poz. 595, z późn. zm.); Rozporządzeniu MNiSW z dn. 03.10.2014 w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynności w przewodach doktorskich, postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. z 2014 r., poz. 1383) oraz komunikatach Centralnej Komisji do spraw stopni i tytułu naukowego.

Rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie zbiór informacji dotyczących zagadnień związanych z realizacją problematyki badawczej (indeks skrótów i oznaczeń, wprowadzenie, przegląd literaturowy, część doświadczalną, bibliografię (144 pozycje), streszczenie, a także podziękowania). Praca została częściowo zrealizowana w ramach Projektu nr WND-POWR.03.02.00-00-I043/16: Interdyscyplinarne studia doktoranckie w inżynierii materiałowej z angielskim jako językiem wykładowym. Projekt był współfinansowany przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego.

1. Wprowadzenie

Powodzenie zabiegów z udziałem biomateriałów oddziaływujących bezpośrednio z krwią uzależnione jest od wielu czynników, do których zaliczyć należy postać konstrukcyjną implantu oraz właściwości fizyczne i chemiczne jego powierzchni, gwarantujące wymaganą hemokompatybilność. Aktualnie prowadzone badania nad poprawą skuteczności w leczeniu chorób serca z wykorzystaniem protez odwzorowujących naturalne zastawki mają na celu wytwarzanie biomateriałów zdolnych do indukowania pożądanej odpowiedzi komórkowej na poziomie molekularnym. Funkcjonowanie

komórek i tkanek w żywym organizmie jest możliwe dzięki odbieraniu sygnałów i reagowaniu na nie. Reakcje te zachodzą głównie poprzez wymianę informacji pomiędzy komórką (jej wnętrzem) a macierzą zewnątrzkomórkową (ECM) pełniącą również dla komórek funkcję podporową. Większość nowych technik aktualnie stosowanych do wytwarzania rusztowań 3D dla inżynierii tkankowej, a także medycyny regeneracyjnej ma na celu naśladowanie naturalnej postaci macierzy zewnątrzkomórkowej. Dlatego też kluczowym wydaje się być zaprojektowanie materiału zawierającego biologicznie aktywne substancje oraz opracowanie mechanizmu kontrolowanego ich uwalniania w trakcie procesu leczenia. Reakcje zachodzące po wprowadzeniu biomateriału do środowiska naturalnego człowieka na granicy faz uzależnione są również od stanu fizykochemicznego powierzchni, co ma bezpośredni wpływ na biokompatybilność, a w przypadku kontaktu z krwią na hemokompatybilność. Stąd też wymóg związany m.in. z właściwościami atrombogennymi, które ściśle związane są z kolei ze zwilżalnością powierzchni, swobodną energią powierzchniową, topografią czy jej morfologią. Zwilżalność powierzchni oraz swobodna energia powierzchniowa wpływa na kinetykę procesów hydroksylacji, hydratacji oraz adsorpcji jonów podczas kontaktu implantu z płynem zewnątrzkomórkowym, przez co wpływa również na proces różnicowania się komórek. Natomiast aktualnie prowadzone badania potwierdzają również, że komórki mogą reagować na skład chemiczny warstwy powierzchniowej, jak i na zmiany jej topografii. Dodatkowo, należy pamiętać, że procesy naprawcze tkanek wymagają coraz częściej stosowania różnego rodzaju rusztowań (podłoży). Obiecującą strategią w tym obszarze wydaje się być biomimetyzm, czyli naśladowanie struktur i procesów występujących naturalnie. Jednym ze sposobów biomimetyzmu jest właśnie próba naśladowania chemizmu macierzy zewnątrzkomórkowej, co oznacza zaprzęgnięcie różnych metod funkcjonalizacji i modyfikacji powierzchni podłoży, tak ażeby komórki nie były w stanie odróżnić matrycy od naturalnej ECM.

Stąd też, biorąc pod uwagę bieżące tendencje dotyczące projektowania materiałów funkcjonalnych dedykowanych konkretnemu zastosowaniu – w tym przypadku – zaprojektowanie materiału do odbudowy i przywróceniu funkcjonalności zastawek serca, problematykę recenzowanej pracy uważam za aktualną i uzasadnioną oraz prawidłowo ukierunkowaną, zarówno w aspekcie poznawczym, jak i użytkowym. Doktorantka w swojej pracy porusza tematykę dotyczącą możliwości odwzorowania tkanki odzwierzęcej na wzór ludzkiej zastawki serca przy wykorzystaniu rusztowania stanowiącego biodegradowalną macierz zewnątrzkomórkową (ECM) otrzymaną w procesie decelularyzacji.

Zagadnienia podjęte w rozprawie wymagały przeprowadzenia badań interdyscyplinarnych, m.in. z zakresu inżynierii materiałowej (w tym biomateriałów), inżynierii powierzchni, inżynierii tkankowej czy oceny biologicznej proponowanych rozwiązań. Świadczy to o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki do podjęcia problematyki badawczej.

2. Ocena części literaturowej rozprawy

Część literaturowa podzielona jest na dwanaście podrozdziałów. Opis w tych podrozdziałach ukierunkowany był głównie na problematykę związaną z budową anatomiczną zastawki aortalnej (na poziomie makro, jak i mikro), występującymi wadami wrodzonymi lub nabytymi czy powstałymi chociażby w wyniku zwyrodnień. Ponadto scharakteryzowano dostępne komercyjnie naturalne protezy zastawek serca, a także przedstawiono tendencje rozwojowe w tym obszarze z uwzględnieniem zagadnień związanych z inżynierią tkankową i wykorzystaniem jej metod do tworzenia nowych rozwiązań materiałowych dedykowanych tego typu wszczepom. Doktorantka również w sposób szczegółowy i czytelny charakteryzuje rolę m.in. śródbłonna w procesie krzepnięcia krwi, który tworzy naturalną warstwę atrombogenną. Opisuje także różne metody wykorzystywane w procesie usuwania komórek z tkanki oraz różnice jakie występują pomiędzy nimi. Zwraca również uwagę na fakt, że każda z nich ma charakter destrukcyjny i powoduje niekorzystny wpływ na tkankę co uniemożliwia otrzymanie czystej macierzy zewnątrzkomórkowej.

Kontrolowana adsorpcja białek, a następnie adhezja komórek do powierzchni jest jednym z krytycznych etapów przygotowania powłok stosownych również na implantach do kontaktu z krwią. Stąd też w celu umożliwienia prawidłowego tworzenia się śródbłonna coraz częściej stosuje się funkcjonalizację powierzchni z wykorzystaniem różnych metod i materiałów, które również szczegółowo zostały wymienione i opisane w tej części pracy. Dobór metod czy rodzaju materiału powłokowego powinien powodować dobrą adhezję komórek i nie wpływać w sposób zasadniczy na zmianę właściwości mechanicznych protez zastawek. Hydrożele wydają się tu być bardzo interesującym rozwiązaniem, w szczególności te na bazie PEO, który został zatwierdzony przez FDA

Systemy dostarczania leków oparte na polimerach biodegradowalnych syntetycznych lub naturalnych oraz zaproponowany mechanizm ich uwalniania stanowią również ważny element wspierający proces leczenia. Stąd też uwzględnienie tej tematyki w ostatnim rozdziale uważam za trafne i istotne z punktu widzenia problemu badawczego. Na podkreślenie zasługuje fakt, że informacje zawarte w tej części rozprawy opracowane zostały przez Doktorantkę na podstawie ponad 100. publikacji naukowych w większości opublikowanych w czasopismach wysoko punktowanych o zasięgu światowym i w dużej części wydrukowanych w ostatnich 5. latach co potwierdza aktualność podjętej problematyki.

Część literaturową rozprawy oceniam pozytywnie. Stanowi ona wystarczającą podstawę teoretyczną do opracowania podjętego tematu pracy.

3. Ocena części merytorycznej rozprawy

Rekonstrukcja pozbawionej komórek tkanki pochodzenia zwierzęcego to złożony a zarazem trudny temat, wymagający podejścia interdyscyplinarnego wykraczający poza klasyczne metody stosowane w inżynierii materiałowej. Zaproszenie do współpracy specjalistów z zakresu medycyny

czy biotechnologii na poszczególnych etapach tak złożonego i wielowątkowego zagadnienia badawczego było w mojej opinii niezbędne i wpłynęło pozytywnie na kompleksowe jego ujęcie.

W ramach części eksperymentalnej pracy Doktorantka przeprowadziła analizę morfologii powierzchni, właściwości mechanicznych oraz odpowiedzi biologicznej odkomórczonej tkanki pochodzenia zwierzęcego (świńska zastawka aortalna). Następnie zaproponowała dwie metody modyfikacji powierzchni ECM umożliwiające hamowanie procesu krzepliwości krwi, w sposób pośredni i bezpośredni. Metoda pośrednia opierała się na zaprojektowaniu i wytworzeniu wielowarstwowych powłok polielektrolitowych (chitosan z siarczanem chondroityny - Chi/CS). Celem było utworzenie warunków pozwalających formowanie się monowarstwy śródbłonka. Właściwości fizykochemiczne powłok były regulowane poprzez proces sieciowania chemicznego oraz poprzez wprowadzenie nanocząstek na bazie węgla. Z kolei metoda bezpośrednia polegała na opracowaniu powłok w oparciu o hydrożele oraz powłok umożliwiających enkapsulację leków i kontrolowane ich uwalnianie. Weryfikowanie skuteczności w hamowaniu procesu krzepnięcia krwi przeprowadzono w oparciu o oddziaływanie na receptor glinokrzemianowy typu IIb/IIIa. Nośniki leku utworzono na podstawie nanokapsuł kopolimeru kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA) oraz kompleksów micelarnych (PECM), które degradowując umożliwiają uwalnianie leku.

Postawiona przez Doktorantkę hipoteza badawcza, *tu cyt. Tkanka pozbawiona komórek pochodzenia zwierzęcego może być dobrym materiałem bazowym do przygotowania podłoży tkankowych o właściwościach zbliżonych do tkanki ludzkiej. Macierz pozbawiona komórek zapewnia idealne rusztowanie do ponownego zasiedlenia poprzez komórki śródbłonka. Inkubacja komórek śródbłonka jest możliwa tylko poprzez modyfikację tkanki powłokami polimerowymi, które mogą być wykorzystane do regulowania procesu wykrzepiania krwi oraz jako systemy dostarczania leków* jest prawidłowo sformułowana i jednoznacznie wynika z podjętego problemu badawczego.

Biorąc pod uwagę fakt, iż powierzchnię biomateriału, w tym przypadku tkanki można tak zmodyfikować, aby przesyłała odpowiednie sygnały dla komórek, dzięki czemu komórki odpowiadają na te sygnały w sposób kontrolowany – zgodnie z naszym zapotrzebowaniem, wytwarzając, np. poszczególne składniki ECM (ExtraCellular Matrix), tj.: cytokiny, białka adhezyjne, strukturalne prezentowane podejście badawcze uważam za prawidłowe. Dla udowodnienia przyjętej hipotezy Doktorantka zaproponowała spójny merytorycznie program badawczy. Również dobór badań potwierdzających przydatność oraz poprawność wykonanych modyfikacji powierzchni odkomórczonej tkanki pochodzenia zwierzęcego w ramach oceny właściwości fizykochemicznych wytworzonych powłok, adsorpcji białek, adhezji komórek oraz interakcji krew-powłoka jest przemyślany i odpowiednio ułożony.

Opracowanie tej części pracy obejmującej badania własne oceniam jako dojrzałe, a wysunięte wnioski za poprawne i udokumentowane wynikami badań. Do najważniejszych osiągnięć Autorki rozprawy w głównej mierze zaliczam:

- modyfikację powłoki Chi/CS poprzez wprowadzenie nanocząsteczek aC:H:N techniką plazmową pod ciśnieniem atmosferycznym, co wpłynęło na zwiększenie jej zdolności do stymulacji komórek śródbłonna, poprawę ich adhezji oraz wzrost,
- opracowanie innowacyjnych koncepcji modyfikowania struktury ECM poprzez zaprojektowanie i wytworzenie powłok polimerowych w postaci folii z wbudowanymi systemami dostarczania leków, a także indukujące ich różnicowanie, mające zarazem pozytywny wpływ na hemokompatybilność,
- opracowanie programu i przeprowadzenie interdyscyplinarnych badań umożliwiających określenie korelacji pomiędzy metodami otrzymywania polimerowych powłok, ich budową oraz wpływem na kinetykę uwalniania leków
- hamowanie procesu wykrzepiania krwi poprzez działanie na receptor glikoproteinowy IIb/IIIa z wykorzystaniem powłok przyjaznych komórkom śródbłonna oraz powłok jako nośników leków

a przede wszystkim...

- opracowanie nowej metody modyfikacji powierzchni tkanki zwierzęcej po procesie decelularyzacji poprzez nałożenie powłok polimerowych otrzymując tym samym kompleksowe systemy dostarczania substancji aktywnych o potencjalnych właściwościach umożliwiających formowanie się monowarstwy śródbłonna co wpływa na poprawę hemokompatybilności materiału, a tym samym może spowodować zwiększenie potencjału aplikacyjnego szczególnie w medycynie regeneracyjnej i inżynierii tkankowej.

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską nasuwają się jednak pewne pytania, mianowicie

- część metod lub procedur badawczych stosowanych przez Doktorantkę jest znormalizowanych, stąd też wydaje się być uzasadnione powoływanie się na wytyczne w nich zawarte w celu potwierdzenia w jaki sposób nastąpił dobór parametrów,
- szkoda, że Doktorantka nie wprowadziła większej liczby parametrów opisując chropowatość powierzchni (jedynie uwzględniony jest parametr Ra). Byłoby to wygodniejsze w określeniu jakości przygotowania powierzchni próbek (powtarzalności) oraz jej wpływu lub nie na pomiary kąta zwilżania. Dodatkowo uważam za celowe podawanie konkretnych wartości chropowatości powierzchni w opisie doświadczeń innych badaczy w podsumowaniu rozprawy zamiast stwierdzeń większa, mniejsza czy gładsza,
- czy dla pełniejszej oceny właściwości warstwy powierzchniowej polimerów na podstawie wyznaczonych przez ciecz pomiarową (wodę destylowaną) kątów zwilżania nie byłoby korzystne również określenie swobodnej energii powierzchniowej. Swobodna energia powierzchniowa jest parametrem bardziej precyzyjnym niż zwilżalność, ponieważ daje możliwość odpowiedzi na pytanie dotyczące względnej wielkości składowych: polarnej i niepolarnej (dyspersyjnej). Towarzyszy ona procesowi tworzenia nowej powierzchni, jest

równa pracy, jaka potrzebna jest do utworzenia jednostkowej powierzchni podczas rozdziału dwóch znajdujących się w równowadze faz. Wprowadzenie pojęcia SEP wpłynęło by również na uszczegółowienie właściwości fizykochemicznych pod kątem odpowiedzi komórkowej dla wymagań co do powłok o zwiększonej hemokompatybilności,

- pewne wątpliwości budzi również pierwszy wniosek, który powstał na podstawie analizy danych literaturowych a nie badań własnych, ponieważ stwierdzenie, że *decelularyzacja zmieniła strukturę ECM* jest powszechnie znane natomiast zaproponowanie poprawy czy naprawy do tego celu *wysokowyspecjalizowanych technik inżynierii powierzchni* jest moim zdaniem stwierdzeniem zbyt ogólnym. Jakie techniki Doktorantka by zaproponowała?
- jak Doktorantka ocenia będący przedmiotem pracy doktorskiej problem jego konkurencyjności w stosunku do innych podobnych produktów/technologii dostępnych na rynku? a także czy Autorka zamierza kontynuować w przyszłości badania nad podejmowanym w rozprawie problemem a następnie wdrożyć ich efekty (wykorzystać opracowane rozwiązania w praktyce klinicznej).

4. Zagadnienia polemiczne i uwagi

Uwagi posiadające w większości charakter dyskusyjny przedstawione zostały w częściach poświęconych ocenie części literaturowej i merytorycznej rozprawy. Uwagi edycyjne oraz drobne nieścisłości zostały Doktorantce przekazane podczas dyskusji.

5. Ocena końcowa

Recenzowaną pracę oceniam pozytywnie. Na podstawie analizy uzyskanych przez Doktorantkę wyników badań oraz wniosków z niej wypływających uważam, że cel pracy został osiągnięty, a hipoteza wystarczająco udowodniona. Doktorantka wykazała się umiejętnością planowania badań, doboru i stosowania nowoczesnych, obejmujących wiele dyscyplin metod badawczych oraz analizy wyników badań i wniosków z nich wynikających.

Wniosek końcowy

Na podstawie analizy rozprawy doktorskiej mgr inż. Gabrieli Imbir pt. „Biomechanical and morphological effect on the acellular animal origin tissue caused by the surface functionalization” stwierdzam, że zawiera ona bardzo wartościowe wyniki poznawcze wnoszące **istotny wkład do inżynierii materiałowej**, a w szczególności inżynierii tkankowej i biomateriałów. Ocenianą pracę cechuje oryginalna tematyka, a udowodnienie postawionej hipotezy wymagało zastosowania autorskiego programu badawczego wykorzystującego interdyscyplinarne metody badawcze. Świadczy to o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do rozwiązywania problemów badawczych z pogranicza techniki, biologii i medycyny jakimi z całą pewnością są nowe funkcjonalne powłoki

dedykowane dla macierzy zewnątrzkomórkowej (acellularnej tkanki odzwierzęcej) hamujące dodatkowo proces wykrzepiania krwi do zastosowań w układzie sercowo-naczyniowym.

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymagania Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w zakresie sztuki z dnia 14.03.2003 r. (Dz. U. poz. 595 z późn. zm.) i **wniosuję do Rady Naukowej Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej o dopuszczenie mgr inż. Gabrieli Imbir do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.**

Dodatkowo, w przypadku pozytywnego przebiegu obrony pracy, biorąc pod uwagę:

- rozwiązanie przez Doktorantkę oryginalnego i aktualnego problemu,
- osiągnięcie zamierzonego celu naukowego pracy,
- kompetencje Doktorantki w uprawianym specjalistycznym obszarze inżynierii materiałowej w szczególności inżynierii biomateriałów,
- dobrą znajomość problematyki w zakresie inżynierii biomedycznej i klinicznej ze szczególnym uwzględnieniem inżynierii tkankowej,
- wykazaną przez Doktorantkę umiejętność zaplanowania i realizacji interdyscyplinarnych badań naukowych z wykorzystaniem bogatego zestawu nowoczesnych metod badawczych,
- poziom naukowy i edytorski przedstawionej pracy.

Recenzent stawia wniosek o rozpatrzenie wyróżnienia pracy doktorskiej mgr inż. Gabrieli Imbir.

