

## **RECENZJA**

### **rozprawy doktorskiej mgr Aldony MZYK**

**pt.: „Multiscale surface functionalization of blood contacting materials” (“Wieloskalowa funkcjonalizacja powierzchni materiałów przeznaczonych do kontaktu z krwią”)  
zrealizowanej pod kierunkiem promotora prof. dr. hab. inż. Bogusław Majora**

Recenzja rozprawy doktorskiej została opracowana na podstawie uchwały Rady Naukowej Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej Polskiej Akademii Nauk w Krakowie z dnia 12.03.2015 roku oraz zlecenia Dyrektora Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej PAN prof. dr. hab. inż. Pawła Zięby (pismo IMIM/DP/733/2015).

### **1. Ocena oryginalności problematyki rozprawy doktorskiej**

Sukces w stosowaniu odpowiednich technik rekonstrukcyjnych lub zabiegowych umożliwiających naprawę uszkodzonych tkanek lub zmian chorobowych warunkowany jest w pierwszej kolejności prawidłowym zdiagnozowaniem struktur tkankowych oraz zdeterminowaniem upośledzeń funkcjonalnych. Realizacja tego etapu wymaga zastosowania właściwych metod diagnostycznych, określonej precyzji, a także doświadczenia lekarza podejmującego ostateczną decyzję o technice zabiegu. Pozytywny efekt samego zabiegu rekonstrukcji będzie uzależniony w znacznym stopniu od optymalnego doboru cech użytkowych implantu, które obejmują nie tylko jego cechy i postać geometryczną ale przede wszystkim zespół właściwości fizykochemicznych biomateriału gwarantujących wymaganą biotolerancję w środowisku tkanek układu krwionośnego (hemokompatybilność). Proponowanie odpowiednich rozwiązań materiałowych i konstrukcyjnych zapewniających wymaganą hemokompatybilność powinno być realizowane z uwzględnieniem specyfiki układu krwionośnego w tym m.in. jego biochemicznych i biofizycznych uwarunkowań oraz aktywności mechanicznej serca.

Analiza uwarunkowań biofizycznych układu sercowo-naczyniowego pozwala uwypuklić cechy środowiska tkankowego, które powinny być kompatybilne z cechami biomateriału oraz powierzchni wszczepianego implantu. Mechanizmy generowania i przewodzenia poten-

cjałów czynnościowych komórek mięśnia sercowego oparte są na transporcie jonów i ładunków elektrycznych przez jego błony komórkowe. Efektem tego jest przepływ prądów czynnościowych o zmiennym natężeniu, które są odpowiedzialne za powstawanie w żywym organizmie zmiennego pola elektrycznego i magnetycznego. Zatem dostosowanie własności fizycznych (elektrycznych i magnetycznych) wszczepów do specyfiki układu sercowo-naczyniowego stanowi istotny czynnik zapewniający prawidłowy przebieg procesów związanych z generowaniem i rozchodzeniem się potencjałów czynnościowych w tkankach mięśnia sercowego.

Własności elektryczne biomateriałów nabierają również szczególnego znaczenia z uwagi na możliwość zainicjowania hemostazy przez wprowadzenie implantu do układu krwionośnego. Przyjmuje się, że na skutek kontaktu krwi ze „sztuczną” powierzchnią w pierwszej kolejności występuje na niej adsorpcja białek (głównie fibrynogenu). W przypadku gdy zaadsorbowany fibrynogen ulega procesowi denaturyzacji, następuje w sposób kaskadowy uaktywnianie się kolejnych płytkowych i osoczowych czynników krzepnięcia krwi. Badania Gutmanna i współpracowników wskazują, że fibrynogen ma strukturę elektronową charakterystyczną dla materiałów półprzewodnikowych. Proces jego przekształcenia z formy nieaktywnej (fibrynogen) w aktywną (fibryna) może być związany z reakcją elektrochemiczną zachodzącą pomiędzy białkiem i powierzchnią materiału kontaktującą się z krwią. Elektrony z pasma walencyjnego fibrynogenu, przekazywane na przykład do materiału implantu, powodują jego rozpad i przekształcenie się w monomer oraz peptyd fibryny. W dalszej kolejności zachodzi proces ich usieciowienia do nieodwracalnej już formy skrzepliny.

O własnościach magnetycznych krwi decyduje hemoglobina. Jako jeden ze składników erytrocytów stanowi główne źródło żelaza w organizmie ludzkim. Tak jak i inne cząsteczki enzymów, składa się z części białkowej (globiny) oraz niebiałkowej (grupy prostetycznej) zawierającej jony Fe tworząc tzw. hemy. Hem jest kompleksem dwu- lub trójwartościowego żelaza i to on decyduje o własnościach magnetycznych krwi. Podstawową rolą hemoglobiny jest transport tlenu z płuc do tkanek głównie z udziałem jonów  $Fe^{2+}$ . Hemoglobina wzbogacona w tlen tworzy oksyhemoglobinę ( $Hb_4O_8$ ). Jest bardzo nietrwała i dlatego łatwo wydziela tlen do tkanek. Z kolei jony  $Fe^{3+}$  tworzą methemoglobinę, która nie ma zdolności do transportu  $O_2$ , tzn. do jego wiązania i uwalniania.

Uwarunkowania biochemiczne układu krwionośnego wynikają m.in. z obecności płynnej tkanki łącznej jaką jest krew. Dla implantów wprowadzanych do układu krwionośnego stanowi ona środowisko korozyjne. Obecność w osoczu krwi kwaśnego węgla sodu ( $NaHCO_3$ ), jedno- i dwuzasadowego kwaśnego fosforanu sodu ( $NaH_2PO_4$  i  $Na_2HPO_4$ ), białek,

a także hemoglobiny zapewnia stałą wartość pH odpowiednią dla procesu homeostazy. Zmiany pH krwi (wynikające przykładowo z procesu biodegradacji implantu) prowadzą do zaburzeń homeostazy.

Aktywność mechaniczna serca warunkowana jest dostarczaniem poprzez tętnice wieńcowe odpowiedniej ilości tlenu do tkanek mięśnia sercowego. Rytmiczne skurcze serca wprowadzają do układu tętniczego w odstępach około 0,8 s taką samą objętość krwi. Z uwagi na duży opór obwodowy krew powoduje odkształcenia podatnych ścian tętnic, rozchodzące się w kierunku obwodowym w postaci tzw. fali tętna. Przepływ krwi przez naczynia wieńcowe różni się od przepływu w innych obszarach, gdyż jest związany z cyklem pracy serca. Aktywność skurczowa mięśnia sercowego ogranicza przepływ w „zatopionych” w nim naczyniach na skutek ich zaciskania przez kurczące się włókna mięśniowe. Ponadto wywołuje zmianę jego objętości, kształtu oraz położenia. Dlatego część naczyń wieńcowych (głównie epikardialnych) podlega dodatkowemu odkształceniu (zginaniu).

Z przeprowadzonych rozważań wynika, iż celowe wydaje się prowadzenie modyfikacji własności fizykochemicznych powierzchni tworzyw implantacyjnych poprzez ich obróbkę powierzchniową. Wytworzenie na powierzchni wszczepów stosowanych w układzie krwionośnym warstwy o dużej odporności korozyjnej, dobrej adhezji i podatnej do odkształceń oraz własnościach półprzewodnikowych lub dielektrycznych może skutecznie ograniczyć proces wykrzepiania krwi na skutek kontaktu z powierzchnią zaimplantowanego wszczepu. W tym kontekście istotną kwestię stanowi również dobór odpowiednich metod badawczych umożliwiających z odpowiednią precyzją weryfikację proponowanych rozwiązań materiałowych i konstrukcyjnych

Tak złożona problematyka ma charakter interdyscyplinarny. Z tego też względu wymaga prowadzenia obszernych badań z zakresu m.in. inżynierii biomateriałów i powierzchni, a także oceny biologicznej proponowanych rozwiązań. W tym też obszarze prowadzone są intensywne badania w wielu ośrodkach kardiologii i inżynierii biomedycznej na świecie. Również krajowe ośrodki naukowe wykazują dużą aktywność w tym zakresie. Dotyczy to m.in. programu „Polskie Sztuczne Serce” sponsorowanego przez NCBiR, a koordynowanego przez Fundację Rozwoju Kardiochirurgii w Zabrze. W programie tym uczestniczyły czołowe, krajowe ośrodki inżynierii biomateriałów, których prace koordynowane były przez prof. Bogusława Majora z Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej PAN w Krakowie.

Na tym tle tematykę rozprawy doktorskiej uważam za aktualną i dobrze uzasadnioną. Budzi duże zainteresowanie zarówno w zakresie poznawczym, dotyczącym aplikacji materiałów w kardiologii, technologicznym dotyczącym aspektów związanych z wytwarzaniem implan-

tów i metodologii oceny ich własności użytkowych, jak i społecznym. Stanowi również kontynuację problematyki badawczej rozwijanej przez prof. Bogusława Majora w Instytucie Metalurgii i Inżynierii Materiałowej Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

## **2. Ocena merytoryczna pracy i uwagi ogólne**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma tradycyjny układ. Składa się z przeglądu piśmiennictwa, poprzedzonego streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wykazem stosowanych oznaczeń, tezy i celu pracy, badań własnych, omówienia wyników badań, podsumowania, wniosków oraz bibliografii. Obejmuje ona 128 stron druku, 59 rysunków, 10 tablic oraz 143 pozycje literaturowe. Praca została wykonana w ramach Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich z zakresu inżynierii materiałowej z wykładowym językiem angielskim i współfinansowanych ze środków UE w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (POKL.04.01.01-00-004/10). Ponadto zawiera również wyniki badań zrealizowanych w ramach projektu 2011/03/D/ST8/04103 finansowanego przez NCN.

Zaprezentowany przegląd piśmiennictwa opracowany został na podstawie pozycji literaturowych obejmujących głównie ostatnie dziesięciolecie. We wstępie Doktorantka rozważyła celowość prowadzenia badań z zakresu poprawy własności fizykochemicznych oraz biologicznych biomateriałów na implanty w układzie sercowo-naczyniowym. Podkreśliła, że realizowana praca stanowi odpowiedź na brak skutecznych, długoterminowych rozwiązań w leczeniu schorzeń układu krążenia oraz konieczność opracowania nowoczesnych materiałów i implantów wspomagających pracę mięśnia sercowego.

Treść rozdziału I.2 stanowi charakterystyka biomateriałów do zastosowań w układzie krwionośnym. Przedstawione informacje ograniczają się zasadniczo do klasyfikacji tej grupy materiałów i zbyt ogólnej charakterystyki tworzyw polimerowych – grupy materiałów, która najczęściej aktualnie znajduje zastosowanie na wyroby do kontaktu z krwią. Również informacje zawarte w tabeli I.1 są zbyt ogólne i powinny uwzględniać dane ilościowe.

W kolejnym rozdziale (rozd. I.3) Doktorantka rozważyła zagadnienia związane z inżynierią powierzchni biomateriałów. W tym zakresie przedstawiła charakterystykę nowoczesnych metod modyfikacji powierzchni (biologiczne oraz chemiczne i fizyczne jak np.: ablacja laserowa, implantacja jonowa, „warstwa po warstwie”). Ponadto dokonała analizy parametrów opisujących własności warstw powierzchniowych w aspekcie ich przydatności do oceny rozwiązań stosowanych w układzie krwionośnym. W tym kontekście celowym byłoby uzupełnienie treści o możliwości badawcze związane z wykorzystaniem m.in. technik mikroskopii sił atomowych (m.in. topografia powierzchni, rozkład potencjału powierzchniowego).

Z uwagi na tematykę podjętą w pracy Doktorantka w kolejnym rozdziale (rozd. I.4) omówiła istotne zagadnienia związane z hemokompatybilnością biomateriałów. Uwypukliła m.in. zagadnienia dotyczące kaskadowego mechanizmu wykrzepiania krwi oraz aktywacji i agregacji płytek krwi. Uzupełnienie tej części pracy stanowią informacje dotyczące metod oceny hemokompatybilności biomateriałów. Następnie w rozdziale I.5 wyeksponowała aktualne trendy w obszarze powłok stosowanych na materiałach do kontaktu z krwią. Na podstawie analizy danych literaturowych w sposób prawidłowy wyróżniła i scharakteryzowała trzy grupy tego rodzaju powłok: chemicznie obojętne (organiczne i nieorganiczne) mające na celu zapobieganie adsorpcji białek i ograniczenie rozwoju dalszych reakcji biologicznych, bioaktywne (polielektrolityczne warstwy) z wprowadzonymi antykoagulantami ograniczającymi proces kaskadowego wykrzepiania i zapobiegających aktywacji płytek krwi oraz warstwy zapewniające szybszą regenerację śródbłónka.

W kolejnym rozdziale (rozd. I.6) Doktorantka wskazała na pewne ograniczenia związane ze stosowaniem omówionych warstw powierzchniowych. Ponadto przedstawiła koncepcję zastosowania obróbki powierzchniowej biomateriału umożliwiającej odtworzenie struktury naturalnego naczynia. Przegląd piśmiennictwa kończy podsumowanie wskazujące na aktualne trendy w rozwoju biomateriałów stosowanych do kontaktu z krwią.

Tę część rozprawy oceniam pozytywnie. Doktorantka przeanalizowała i umiejętnie zsyntetyzowała istotne zagadnienia fizykochemiczne, które powinny być uwzględniane przy modyfikowaniu powierzchni biomateriałów do kontaktu z krwią. Prawidłowy dobór pozycji literaturowych świadczy o dobrym rozeznaniu Autorki w problematyce badawczej realizowanej w różnych ośrodkach inżynierii biomedycznej i klinicznych. Zastrzeżenia dotyczące tej części pracy odnoszą się do zbyt rozbudowanej struktury rozdziału I.3, co utrudnia jego lekturę.

Na podstawie analizy przeglądu piśmiennictwa Doktorantka w rozdziale II sformułowała tezę i cele naukowe pracy. Teza pracy nawiązuje do współczesnych trendów w projektowaniu i kształtowaniu biomimetycznych materiałów na bazie poliuretanu i polichlorku winylu poprzez zastosowanie wieloskalowej funkcjonalizacji powierzchni zapewniającej wymaganą hemokompatybilność.

Kolejna część pracy dotyczy badań własnych Doktorantki (rozd. III). Doktorantka przedstawiła informacje dotyczące badanych biomateriałów, ich obróbki powierzchniowej, metody badawczą oraz wyniki badań. Zaprezentowana koncepcja pracy oparta została na możliwości poprawy hemokompatybilności powierzchni implantów poprzez zastosowanie metod obróbki powierzchniowej umożliwiającej odtworzenie struktury naturalnego naczynia krwionośnego składającego się z pozostającej w bezpośrednim kontakcie z krwią warstwy śród-

blonka oraz tkanek mięśniowych gładkich. Dla odtworzenia wielowarstwowej struktury ściany naczynia zaproponowane zostało dwutorowe podejście do projektowania i przygotowania odpowiednich materiałów pod zasiedlanie komórkowe. W ramach pracy zrealizowane zostały badania prowadzone nad wytworzeniem powłok pod zasiedlanie komórkami tkanki mięśniowej gładkiej, równoległe z działaniami ukierunkowanymi na przygotowanie rusztowań umożliwiających efektywne tworzenie monowarstwy komórek śródbłonka.

Materiały bazowe (poliuretan, polichlorek winylu) modyfikowano poprzez nakładanie metodą magnetronową cienkich warstw ceramicznych. Powłoki te posłużyły jako baza do wytworzenia techniką laserowej litografii interferencyjnej kanałów migracyjnych kształtujących topografię powierzchni, a w konsekwencji wpływających na możliwość sterowania wzrostem komórek tkanki mięśniowej gładkiej. Rusztowania dla komórek śródbłonka uzyskano metodą „warstwa po warstwie” z wykorzystaniem polimerów pochodzenia naturalnego. Analizie poddano wielowarstwy na bazie poli-L-lizyna/kwas hialuronowy (PLL/HA), poli-L-lizyna/alginian sodu (PLL/ALG) oraz chitozan/siarczan chondroityny (Chi/CS). Własności warstw regulowano w procesach sieciowania chemicznego. Stabilność, jak i właściwości przeciwbakteryjne porowatych wielowarstwowych powłok polimerowych uzyskano poprzez wprowadzanie płatków grafenu, nanocząstek węgla krzemu lub srebra. Uzyskane metodami obróbki powierzchniowej podłoża zostały scharakteryzowane m.in. pod kątem struktury (m.in. z wykorzystaniem wysokorozdzielczej transmisyjnej mikroskopii elektronowej), własności mechanicznych, morfologii, zwilżalności powierzchni, właściwości przeciwbakteryjnych, efektywności adsorpcji białka. Bardzo szeroki zakres pomiarów Doktorantka zrealizowała w zakresie badań hemokompatybilności wykraczający poza zalecane i obowiązujące w normie ISO 10993. Test Impact R umożliwił analizę adhezji i agregacji trombocytów w środowisku krwi wzbogaconej środkiem antykoagulacyjnym (cytrynian sodu). Do przeprowadzenia badań symulujących laminarny przepływ aortalny w elementach rurowych Doktorantka wykorzystowała stanowisko pomiarowe opracowane w Instytucie Metalurgii i Inżynierii Materiałowej. W teście tym analiza adhezji prowadzona była z udziałem naprężeń ścinających.

Ogólnie tę część pracy oceniam pozytywnie. Dla udowodnienia przyjętej tezy Autorka zaproponowała spójny merytorycznie obszerny program badawczy obejmujący wiele metod z różnych dyscyplin. Wyniki zrealizowanych badań zostały w sposób prawidłowy zinterpretowane i udokumentowane. W ramach pracy Doktorantka sprecyzowała m.in. warunki kontroli migracji i wzrostu komórek tkanki mięśniowej gładkiej w kierunku uzyskania organizacji komórkowej analogicznej do obserwowanej w ścianie naczynia krwionośnego. Wykazała, iż mikrowzornictwo oparte na procesie ablacji prowadzi do zmian mikrostruktury i chropowato-

ści powłoki a-C:H:Si, a mechanizm odpowiedzi komórkowej zależy jedynie od geometrii mikrowzorów. Wytworzone kanały migracyjne pozwoliły na uzyskanie podczas kontrolowanego wzrostu połączeń międzykomórkowych, co do tej pory nie zostało opisane w literaturze.

Po zapoznaniu się z tą częścią rozprawy doktorskiej nasuwają się również pewne uwagi i wątpliwości do których zaliczam:

- brak informacji dotyczących np. własności mechanicznych, topografii materiału bazowego (poliuretan, polichlorek winylu) istotnie wpływających na przydatność proponowanych rozwiązań materiałowych,
- brak informacji dotyczących podatności do odkształceń i adhezji wytworzonych warstw powierzchniowych do materiału podłoża (poliuretan, polichlorek winylu),
- czy warunki prowadzenia badań własności mechanicznych (głębokość penetracji wgłębnika) uwzględniały grubość analizowanych warstw powierzchniowych,
- jakie czynniki determinowały zakres temperaturowy ( $T = -50^{\circ}\text{C} \div +50^{\circ}\text{C}$ ) prowadzonych badań stabilności termicznej,
- mała czytelność opisów prezentowanych na rysunkach, np.: rys. III.6 (str. 54), rys. III.9 i III.10 (str. 56 i 57), rys. III.11 i III.12 (str. 58), fig. III.3.2 (str. 76),
- zbyt rozbudowana struktura w szczególności rozdziału III.1.

Wymienione uwagi są w większości szczegółowe i nie wpływają na wartość naukową rozprawy. Doktorantka w rozprawie wykazała bardzo dobre rozeznanie w analizowanej problematyce badawczej. Sformułowane zagadnienia z obszaru inżynierii materiałowej, jak i inżynierii biomedycznej są prawidłowe i wskazują na umiejętność dojrzałego prowadzenia zaawansowanych badań naukowych. Doktorantka wykazała się również dobrą znajomością zagadnień opisywanych w literaturze nie tylko z zakresu inżynierii materiałowej, ale także z zakresu medycyny – kardiologii. Zapoznanie się z tym działem medycyny stanowiło niezbędny warunek dla prawidłowego rozwiązania analizowanego problemu badawczego.

Rozprawę doktorską kończy podsumowanie z dyskusją oraz wnioski końcowe. W dyskusji ujęte zostały interdyscyplinarne zagadnienia ukierunkowane na zastosowanie nowoczesnych metod modyfikacji powierzchni do zastosowań funkcjonalnych jako biomateriały przeznaczone do kontaktu z krwią. W opinii recenzenta korzystniejszym byłoby opracowanie dyskusji wyników w powiązaniu z różnymi metodami badawczymi, a nie oddzielnie w odniesieniu do poszczególnych zastosowanych metod.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera cenne elementy poznawcze i utylitarne. Do najważniejszych osiągnięć mgr Aldony Mzyk zaliczam:

- opracowanie warunków wytwarzania warstw powierzchniowych na podłożu z biomateriałów polimerowych i określeniu korelacji pomiędzy ich strukturą, własnościami fizycznymi, a ich hemokompatybilnością,
- sprecyzowanie warunków kontroli migracji i wzrostu komórek tkanki mięśniowej gładkiej w kierunku uzyskania organizacji komórkowej analogicznej do obserwowanej w ścianie naczynia krwionośnego,
- umiejętność sformułowania założeń badawczych i włączenia do rozwiązania interdyscyplinarnego zadania badawczego metod z kilku dyscyplin.

### 3. Uwagi końcowe

Na podstawie analizy przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej mgr Aldony Mzyk pt. „**Multiscale surface functionalization of blood contacting materials**” („**Wieloskalowa funkcjonalizacja powierzchni materiałów przeznaczonych do kontaktu z krwią**”) stwierdzam, że zawiera ona wartościowe wyniki poznawcze wnoszące duży wkład do inżynierii materiałowej, a w szczególności inżynierii biomateriałów. Przedstawione do oceny badania stanowią wynik dojrzałej koncepcji rozwiązania problemu naukowego. Rozprawę cechuje oryginalność problematyki oraz bogactwo zastosowanych nowoczesnych metod badawczych. Doktorantka posiada ugruntowaną wiedzę z zakresu inżynierii materiałowej, co umożliwia jej wykorzystywanie przy analizowaniu zagadnień związanych z inżynierią biomedyczną.

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Aldony Mzyk 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 2003 roku) i na tej podstawie **wnio-  
skuję do Rady Naukowej Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej PAN o dopusz-  
czenie mgr Aldony Mzyk do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.**

