



Lublin, 18.07.2023

Dr hab. Anna Belcarz
Katedra i Zakład Biochemii i Biotechnologii
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr inż. Jakuba Włodarczyka**
z tytułem:

**„Elektroprzędzone dwustrumieniowo poliestrowo-poliuretanowe włókny do
zastosowań w leczeniu przepuklin”**

wykonanej w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych
Polskiej Akademii Nauk

pod kierunkiem

Pana prof. dr hab. n. farm. Janusza Kasperczyka (promotor)

i

Pana dr Michała Soboty (promotor pomocniczy)

Ogólny opis problematyki badawczej poruszanej w rozprawie doktorskiej

Oceniana rozprawa doktorska dotyczy tematyki leczenia przepuklin za pomocą implantów w postaci siatek chirurgicznych. Jak podaje Autor rozprawy powołując się na dane literaturowe, problem ten dotyczy w mniejszym lub większym stopniu 3–4% ogólnoswiatowej populacji, biorąc pod uwagę osoby powyżej 45 roku życia (według szacunków z 2008 roku). Problematyczne w leczeniu przepukliny jest wysokie ryzyko jej nawrotu, który jest częstym powikłaniem i dotyczy nawet 20% przypadków. Dodatkowo Autor zwraca uwagę na fakt, że problemy cywilizacyjne takie jak siedzący tryb życia oraz otyłość powodują osłabienie newralgicznych obszarów mięśni i powięzi w obrębie jamy brzusznej oraz pachwiny, co zwiększają prawdopodobieństwo wystąpienia przepukliny.



Zjawisko to sprawia, że w najbliższych dekadach należy oczekiwać zwiększenia się skali problemu związanego z występowaniem przepuklin, co uzasadnia prowadzenie intensywnych badań.

Biorąc pod uwagę te fakty, Autor rozprawy proponuje krok w kierunku rozwiązania tego problemu poprzez opracowanie siatki chirurgicznej z włókniny wytwarzanej metodą elektroprzędzenia polimerów biodegradowalnych, zawierających leki wspomagające proces leczenia przepukliny. Obraz problemu zdrowotnego leżącego u podstaw wyboru zagadnienia badawczego oraz kompleksowość zaprojektowanych w pracy eksperymentów mających na celu zweryfikowanie postawionej hipotezy sprawia, że nie można mieć wątpliwości co do zasadności celu, jaki postawił przed sobą Autor.

Formalna ocena rozprawy

Rozprawa doktorska Pana mgr inż. Jakuba Włodarczyka jest bardzo obszerna i obejmuje łącznie z sekcją literaturową 226 stron tekstu. Układ pracy jest dość typowy dla tego typu eksperymentalnych rozpraw, chociaż dla Czytelnika nieco dezorientujący jest brak wyraźnego wskazania miejsca rozgraniczającego opis metodyki oraz rezultatów wykonanych badań (np. nie jest w pełni jasne, czy punkt 13: „Otrzymywanie włóknin metodą dwustrumieniowego przędzenia” należy jeszcze do części metodycznej, czy już do wyników badań). Autor wydzielił osobne rozdziały na Spis rysunków i Spis tabel, co ułatwia poruszanie się w tak obszernej pracy, a także Wykaz skrótów oraz Streszczenie w języku angielskim, a na końcu pracy wnioski i spis cytowanej literatury (273 pozycje anglojęzyczne, głównie z ostatnich lat).

Merytoryczna ocena rozprawy

Wstęp teoretyczny zawiera prezentację wiedzy odnośnie aktualnych trendów w leczeniu przepuklin oraz przegląd i ogólną charakterystykę biopolimerów najczęściej stosowanych do wytwarzania siatek chirurgicznych do leczenia tych defektów. Uznając, że taka siatka powinna być nośnikiem leków wspierających proces leczenia przepukliny, Autor odnosi się drobiazgowo do stanu wiedzy dotyczących systemów kontrolowanego uwalniania leków. Na uwagę zasługuje fakt, że zarówno charakterystyka procesów rządzących uwalnianiem leków, jak i matematyczne modele ich uwalniania opisane są w sposób



wyczerpujący, a jednocześnie klarowny i zrozumiały. Autor wprowadza także czytelników w charakterystykę mechanizmu elektroprzewodzenia włókien polimerowych, wskazując na złożoność krytycznych parametrów rządzących tym procesem. Zastosowany sposób prezentacji zebranej wiedzy podpowiada jednocześnie, jakie parametry wytworzonych w toku badań włókien powinny być poddawane szczególnie drobiazgowej analizie, jako wyjątkowo istotne dla procesu leczenia przepuklin.

„**Hipoteza badawcza i cel pracy**” zostały sformułowane klarownie i jasno, z wyszczególnieniem głównych założeń pracy badawczej Autora. Na uwagę zasługuje również wprowadzenie dodatkowego rozdziału, zatytułowanego „Zakres pracy”, który porządkuje kolejne eksperymenty badawcze w kontekście wyników, które chciał uzyskać Autor. Istotne jest, że przedstawione eksperymenty obejmują nie tylko wytworzenie różnych typów włókien zawierających leki, ale też i ich charakterystykę w stanie pierwotnym oraz w różnych punktach okresu symulowanej biodegradacji, która w każdym przypadku trwa około pół roku. Biorąc pod uwagę, że wnioski płynące z eksperymentu poprzedzającego stanowią bazę dla zaplanowania kolejnego testu, jasnym jest, że cały plan badań został precyzyjnie zaprojektowany, w oparciu nie tylko o głęboką wiedzę i zrozumienie problemu, ale też niewątpliwie o wyniki badań pilotażowych. W tym miejscu należy złożyć gratulacje i wyrazy uznania zarówno Doktorantowi, jak i Promotorom Jego pracy.

Kolejne rozdziały opisujące **materiały i metodykę pracy** zostały opracowane klarownie i wyczerpująco, w sposób umożliwiający powtórzenie wszystkich w zasadzie doświadczeń. Autor wziął tu pod uwagę liczne zjawiska istotne w procesie leczenia przepukliny za pomocą siatek chirurgicznych, takie jak budowa chemiczna otrzymanych kopolimerów, ich parametry mechaniczne, zwilżalność włókien oraz pochłanianie wody, przenikalność cząstek aktywnych, biodegradacja, uwalnianie leków oraz cytotoksyczność. Kilka szczegółów dotyczących metodyki badań przydałoby się uściślić, co zaznaczam w odrębnej sekcji tej recenzji.

Kolejne rozdziały pracy przedstawiają **wyniki** uzyskane w kolejnych eksperymentach związanych z wytwarzaniem włókien mających stanowić bazę proponowanych siatek chirurgicznych oraz spostrzeżenia Autora co do uzyskanych danych. Należy tu podkreślić, że oceniana praca jest wysoce złożona ze względu na ogrom czynników, które Autor postanowił wziąć pod uwagę w projektowaniu eksperymentów. Należy tu wymienić m.in. cechy



fizykochemiczne degradowalnych i niedegradowalnych polimerów użytych w procesie przedzenia, rodzaj rozpuszczalnika, charakter chemiczny i stężenie leków wprowadzonych do matrycy. Czynniki te wpłynęły następnie na procesy degradacji matryc i uwalniania przez nie leków w zastosowanym modelu degradacji/uwalniania leku (inkubacja w PBS pH 7,4 w temperaturze fizjologicznej ciała ludzkiego), a ich wzajemne interakcje powodowały złożone zmiany przebiegu obserwowanych zjawisk. Biorąc powyższe pod uwagę, należy wyrazić uznanie Autorowi, który zgrabnie poradził sobie z analizą często sprzecznych zjawisk kierujących obserwowanym procesem. Mimo tak skomplikowanych zależności pomiędzy właściwościami włókien a obserwowanymi procesami, Autor zdołał je przedyskutować w świetle dostępnej literatury (w rozdziale 17 zatytułowanym „**Podsumowanie**”). Udało mu się też wysnuć pewne prawidłowości (opisane w rozdziale „**Wnioski**”), które mogą stanowić podpowiedzi odnośnie projektowania elektroprzędzonych włókien dla celów wytwarzania siatek chirurgicznych/nośników leków do leczenia przepuklin. Prawidłowości te podkreślają przede wszystkim zasadność stosowania przeplotu włókien degradowalnych i niedegradowalnych polimerów przedzonych w określonych warunkach, co pozwala na zoptymalizowanie funkcjonalności wytworzonych włókien. Sugerują one ponadto, że głównie hydrofilowość wprowadzonego do matrycy leku, a nie jego ilość, wpływa na dynamikę jego uwalniania oraz proces erozji włókniny. Tworzą też cenne punkty wyjścia do dalszych badań nad opracowywaniem nośników leków o długotrwałej i kontrolowanej kinetyce ich uwalniania.

Uwagi dotyczące strony merytorycznej rozprawy

Praca doktorska Pana mgr inż. Jakuba Włodarczyka jest przykładem rozpraw doskonale zaplanowanych, przeprowadzonych i opisanych. Rola recenzenta narzuca jednak wskazywanie nie tylko silnych, ale również słabszych stron rozprawy. Zauważyłam kilka nieścisłości i sformułowałam kilka uwag, które pozwolę sobie przedstawić poniżej, z prośbą o komentarz:

- Test przenikania barwnika wyraża zdolność cząsteczek rozpuszczalnych do migracji poprzez membranę, którą są badane włókniny. Dlaczego test ten został pominięty przy analizie włókien wytworzonych dla celów eksperymentu 1?



- W rozdziale 12.1., opisującym metodykę wytwarzania PLGA nie podano proporcji monomerów D,L-laktydu i glikolidu. Czy ten szczegół jest nieistotny? Wydaje się mieć znaczenie w świetle konieczności oczyszczania zsyntetyzowanego polimeru z nieprzereagowanego D,L-laktydu.

- W najczęściej cytowanych źródłach nanowłóknami określa się włókna o średnicy nieprzekraczającej 100 nm, choć zdarzają się też publikacje, określające jako nanowłókna struktury o średnicy poniżej 1000 nm. Na jakiej definicji oparł się Autor określając włókna poliuretanowe wytworzone w procesie przędzenia jako „nanowłókna”?

- W opisie degradacji włókniny PDLGA/0/H podano, że po 168 dniach inkubacji rozpadła się ona (Rys. 31C). Tymczasem analogiczna włóknina PDLGA/5/H, zawierająca sól sodową diklofenaku, w analogicznym punkcie czasowym nie rozpadła się, choć uległa znacznej degradacji (Rys. 32C). Ta ostatnia włóknina zawierała łatwo rozpuszczalny lek, który szybko uwolnił się do otoczenia, powodując powstanie nanoporów (str. 99). Rozpuszczenie leku i powstanie nanoporów w teorii powinno przyspieszyć proces erozji matrycy, jednak stało się odwrotnie. Jak Autor mógłby skomentować to zjawisko?

- W rozprawie zadeklarowano, że „*Kąt zwilżania wodą powierzchni wyjściowych polimerów oraz włókien zmierzono za pomocą goniometru optycznego (CAM 101, KSV Instruments Ltd., Finlandia).*” Istotnie, polimery wyjściowe scharakteryzowano za pomocą wspomnianej metody, jednak wydaje się, że spośród włókien jedynie dla PCLTCM:PCU/ChronoFlex podano wartość kąta zwilżania (str. 177). Czy wartości kąta zwilżania pozostałych włókien zostały również zbadane?

- Zaprezentowane wyniki są przedstawione jako średnie wartości pomiarów z odchyleniami standardowymi. Jednak nie zauważyłam, żeby dla jakichkolwiek eksperymentów została dokonana analiza statystyczna. Tymczasem jest ona niezwykle istotna przy formułowaniu wniosków, w szczególności płynących z badań komórkowych. Widoczne to jest np. na rysunku 69, gdzie wartości fluorescencji definiujące adhezję fibroblastów do matrycy wykazują w większości przypadków znaczne odchylenia standardowe. Czy Autor może wytłumaczyć, dlaczego nie uwzględnił analizy statystycznej w swojej pracy?

- Na rysunku 53 pokazano obraz włókna PDLGA przędzonego z rozpuszczalnika DCM i wskazano, że wykazuje on większą porowatość w porównaniu z analogicznym włóknem przędzonym z rozpuszczalnika HFIP. W tym miejscu w moim odczuciu brakuje



rysunku przedstawiającego to ostatnie włókno w takim samym powiększeniu, dla celów porównawczych.

- W odniesieniu do badań komórkowych, ciekawe byłoby ustalenie, jak zmienia się adhezja fibroblastów po upływie 3 dni, zwłaszcza, że kontakt siatki ze środowiskiem jamy brzusznej przewidziany jest na długi, kilkumiesięczny okres. Aczkolwiek na stronie 171 Autor zaznacza, że planuje przeprowadzić takie eksperymenty w przyszłości, brakuje mi ich w recenzowanej rozprawie.

Uwagi dotyczące strony edytorskiej rozprawy

Rozprawa jest napisana jasnym, poprawnym i zrozumiałym językiem. Przy tak obszernej pracy, trudno byłoby uniknąć pewnych niedociągnięć i rzeczywiście, zanotowano niezbyt liczne błędy wynikające głównie z usterek edytorskich. Ich przykłady to:

- podwójne użycie sformułowania „ulegające bioabsorpcji” na stronie 22 (jedno z nich powinno zapewne brzmieć: „nieulegające bioabsorpcji”).

- brak jednolitości graficznej w przedstawianiu cytowań w tekście (niektóre zawierają spacje w nawiasach kwadratowych, a inne nie).

- na rysunkach przedstawiających membrany po inkubacji z barwnikiem (Rys. 67, 82) w moim odczuciu brakuje zdjęć tych samych membran przed inkubacją z barwnikiem dla celów porównawczych.

- omyłki edytorskie (np. Nersta zamiast Nernsta, str. 43; „uwadniania” zamiast „uwalniania”, str. 77; dwukrotne użycie słowa „biodegradowalnym” w drugiej linijce strony 85; zbędna litera „w” w przedostatniej linijce str. 85; „utraciła” i „wzrostu”, str. 103; „zamin”, str. 136; „powadzeniu”, str. 139 itd.). Zdanie: „Ponadto, że włókniny otrzymane metodą elektroprzędzenia, ze względu na podobieństwo struktury do macierzy pozakomórkowej, sprzyjają proliferacji komórek, co może wspomagać proces gojenia [26].” (str. 210) jest nielogiczne.

- niepotrzebne wtrącenia (np. „Wynika z praw dyfuzji.”, str. 49).

- Na rysunkach 60 oraz 83, w wykresach zależności Mn od czasu bądź przeżywalności komórek, legenda jest niepełna. Z kolei w insecie do rysunku 79 pojawia się piąta (różowofioletowa) seria bez znaczników, nie ujęta w legendzie.



- w Spisie treści nie podano spisu tabel, wykazu skrótów ani sekcji „7. Podsumowanie części literaturowej”, pojawiającej się na stronie 69. Nie ma w nim także umiejscowienia początku Części literaturowej (str. 17) i Części eksperymentalnej (str. 70).

- pewne definicje zawierają błędy (str. 15; NF – Narodowy Recepteriusz (ang. National Formulary) zamiast Narodowy Receptariusz (ang. National Formulary).

Zaznaczam jednak, że wymienione uwagi nie wpływają na merytoryczną i ogólną ocenę rozprawy, którą oceniam bardzo wysoko.

Wnioski końcowe

Zaprezentowana do oceny rozprawa Pana mgr inż. Jakuba Włodarczyka stanowi imponujące, oryginalne osiągnięcie badawcze o bardzo szerokim zakresie, wysokim poziomie badawczym i dużym potencjale aplikacyjnym, zwłaszcza że dotyczy ona narastającego, ogólnościowego i bardzo istotnego problemu zdrowotnego. Jakość Rozprawy świadczy o dojrzałości Autora, umiejętności dalekowzrocznego planowania eksperymentów, zastosowania odpowiednich metod eksperymentalnych, umiejętności wysnuwania wniosków i krytycznej analizy wyników badań własnych. Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742).

Uprzejmie przedstawiam Radzie Naukowej Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk w Zabrzu wniosek o dopuszczenie Pana mgr inż. Jakuba Włodarczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę zakres pracy, wartość poznawczą i praktyczną zaprezentowanych w niej wyników oraz dojrzałość naukową, chciałabym również zwrócić się do Rady z wnioskiem o wyróżnienie pracy. Jednocześnie Autorowi życzę dalszych sukcesów naukowych.

Z wyrazami szacunku


KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Biochemii i Biotechnologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

dr hab. Anna Belcarz