



Politechnika Warszawska

Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej

załącznik nr 2

Autoreferat

dr inż. Beata Butruk-Raszeja

Warszawa, 2023

Plac Politechniki 1,
00-661 Warszawa

tel.: 22 628 59 85,

fax 22 234 72 04

e-mail:

Beata.Raszeja@pw.edu.pl

1. Imię i nazwisko

Beata Butruk-Raszeja (nazwisko rodowe: Butruk)

ORCID: 0000-0002-2074-1944

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- grudzień 2013 stopień naukowy: **doktor** (z wyróżnieniem)
tytuł rozprawy doktorskiej: „Wytwarzanie i charakterystyka własności pokryć dla materiałów kontaktujących się z krwią”
promotor: prof. dr hab. inż. Tomasz Ciach
podmiot nadający: Politechnika Warszawska,
Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Warszawa
- luty 2010 tytuł zawodowy: **licencjat**
tytuł pracy licencjackiej: „Możliwości wykorzystania narzędzi genomicznych w kardiologii”
promotor: prof. dr hab. Michał Jank
podmiot nadający: Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego,
Wydział Biologii i Rolnictwa, Warszawa
- wrzesień 2008 tytuł zawodowy: **magister inżynier**
tytuł pracy magisterskiej: „Biodegradowalne implanty kostne wykonywane techniką spieniania”
promotor: prof. dr hab. inż. Tomasz Ciach
podmiot nadający: Politechnika Warszawska,
Międzywydziałowe Centrum Biotechnologii, Warszawa

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

- a) marzec 2014 – obecnie: Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa, stanowisko: adiunkt
- b) wrzesień 2012 – marzec 2014: Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa, stanowisko: samodzielny referent naukowo-techniczny

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

A. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Metody otrzymywania funkcjonalizowanych protez naczyniowych

B. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia

Na cykl składa się 10 artykułów (H1-H10) oraz jeden patent (H11). Prace H2-H10 zostały opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora. Praca H1 powstała przed uzyskaniem stopnia doktora (zgodnie z wytycznymi zawartymi w Poradniku Habilitanta Rady Doskonałości Naukowej możliwe jest wykazanie dorobku powstałego przed nadaniem stopnia doktora).

(H1) **B. Butruk**, M. Trzaskowski, T. Ciach*: *Fabrication of biocompatible hydrogel coatings for implantable medical devices using Fenton-type reaction*, *Materials Science & Engineering C - Materials for Biological Applications*, 2012, vol. 32, nr 6, s.1601-1609

IF = 2,404 (7,9) MEiN = 25 pkt (20) cytowania = 25

(H2) **B. Butruk-Raszeja***, I. Łojczyk, T. Ciach, M. Kościelniak–Ziemniak, K. Janiczak, R. Kustosz, M. Gonsior: *Athrombogenic hydrogel coatings for medical devices – Examination of biological properties*, *Colloids and Surfaces B– Biointerfaces*, 2015, vol. 130, s. 192-198

IF= 3,902 (5,8) MEiN = 35 (100) pkt cytowania = 16

(H3) **B. Butruk-Raszeja***, M. Dresler, A. Kuźmińska, T. Ciach: *Endothelialization of polyurethanes: Surface silanization and immobilization of REDV peptide*, *Colloids and Surfaces B– Biointerfaces*, 2016, vol. 144, s. 335-343

IF = 3,887 (5,8) MEiN = 35 (100) pkt cytowania = 23

(H4) **B. Butruk-Raszeja***, P. Trzaskowska, A. Kuźmińska, T. Ciach: *Polyurethane modification with acrylic acid by Ce(IV)-initiated graft polymerization*, *Open Chemistry*, 2016, vol. 14, nr 1, s.206-214

IF = 1,027 (2,3) MEiN = 14 (70) pkt cytowania = 5

(H5) **B. Butruk-Raszeja***, A. Kuźmińska, T. Ciach, I. Adipurnama, M.–Ch. Yang: *Endothelial cell growth on polyurethane modified with acrylic acid and REDV peptide*, *Surface Innovations*, 2020, vol. 8, nr 1-2, s. 89-104

IF = 3,016 (3,5) MEiN = 40 (40) pkt cytowania = 4

(H6) I. Łopianiak*, **B. Butruk-Raszeja** *Evaluation of sterilization/disinfection methods of fibrous polyurethane scaffolds designed for tissue engineering applications*, *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, vol. 21, nr 21, s.1-18

IF = 5,924 (5,6) MEiN = 140 (140) pkt cytowania = 11

(H7) I. Łopianiak, M. Wojasiński, A. Kuźmińska, P. Trzaskowska, **B. Butruk-Raszeja***: *The effect of surface morphology on endothelial and smooth muscle cells growth on blow-spun fibrous scaffolds*, **Journal of Biological Engineering**, 2021, vol. 15, nr 1, s. 1-17

IF = 6,248 (5,6) MEiN = 140 (140) pkt cytowania = 0

(H8) Łopianiak I., Rzempełuch W., Civelek M., Cicha I., Ciach T., **Butruk-Raszeja B***: *Multilayered blow-spun vascular prostheses with luminal surfaces in Nano/Micro range: the influence on endothelial cell and platelet adhesion*, **Journal of Biological Engineering**, 2023, vol. 17, nr 1, s.1-17

IF = 5,600 MEiN = 140 pkt cytowania = 0

(H9) **B. Butruk-Raszeja***, A. Kuźmińska, M. Wojasiński, Z. Piotrowska: *Physicochemical and mechanical properties of blow spun nanofibrous prostheses modified with acrylic acid and REDV peptide*, **Coatings**, 2020, vol. 10, nr 11, s. 1– 20

IF = 2,881 (3,4) MEiN = 100 (100) pkt cytowania = 3

(H10) A. Kuźmińska*, **B. Butruk-Raszeja**, A. Stefanowska, T. Ciach: *Polyvinylpyrrolidone (PVP) hydrogel coating for cylindrical polyurethane scaffolds*, **Colloids and Surfaces B- Biointerfaces**, 2020, vol. 192, s. 1-6

IF= 5,268 (5,8) MEiN = 100 (100) pkt cytowania = 21

(H11) T.Ciach, **B. Butruk- Raszeja**, A. Kuźmińska, M. Wojasiński, “Sposób wytwarzania protez naczyniowych małych średnic”, data udzielenia patentu 24.06.2021, numer patentu: 238765

Dane bibliometryczne dla pozycji H1– H10:

Suma IF (liczony dla roku opublikowania pracy) = **40,157**

Średni IF = **4,016**

Suma IF₂₀₂₂ = **51,3**

Średni IF₂₀₂₂ = **5,13**

Suma cytowań publikacji z cyklu (bez autocytowań) = **108**

* oznaczono autora korespondencyjnego

Podano współczynnik IF z roku publikacji, w nawiasie IF za rok 2022

Podano liczbę punktów MEiN wg wykazu czasopism obowiązującego w roku opublikowania pracy, w nawiasie liczbę punktów wg wykazu czasopism z dnia 17.07.2023

cytowania – liczba cytowań bez autocytowań (wg Scopus, z dnia 22.09.2023)

Oświadczenie dotyczące mojego wkładu autorskiego w powstanie każdej z powyższych prac umieściłam w **Załączniku 5**. Oświadczenia współautorów zawiera **Załącznik 6**.

Kopie publikacji zawiera **załącznik 9**.

C. Omówienie celu naukowego oraz wyników opisanych w cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

4.1. Opis kariery zawodowej

Moje zainteresowania naukowe od początku mojej aktywności zawodowej skupiały się na tematyce z pogranicza chemii, nauk technicznych, biologii i medycyny. Studiowałam Biotechnologię na Politechnice Warszawskiej (studia magisterskie, 2003-2008) oraz Biologię w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (studia licencjackie, 2006-2010). W 2008 roku obroniłam pracę magisterską, której tematyka dotyczyła metod wytwarzania implantów kostnych. Jednocześnie kontynuowałam studia na kierunku Biologia, gdzie w 2010 roku obroniłam pracę licencjacką dotyczącą badania możliwości wykorzystania narzędzi genomicznych w diagnostyce chorób kardiologicznych.

W 2008 roku rozpoczęłam studia doktoranckie na Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej (2008-2013). W tym okresie poznałam i nauczyłam się wykorzystywać narzędzia, jakie oferuje inżynieria chemiczna w rozwiązywaniu problemów z obszarów biomedycznych. Działalność naukowa na studiach doktoranckich to przede wszystkim praca w ogólnopolskim projekcie Polskie Sztuczne Serce, koordynowanym przez Fundację Rozwoju Kardiochirurgii im. Prof. Zbigniewa Religii w Zabrze. Projekt miał na celu rozwój technologii prowadzących do stworzenia nowej generacji komór wspomagania pracy serca. Moim zadaniem było opracowanie technologii hydrofilizacji powierzchni polimerów medycznych celem poprawy ich biozgodności. Rozpoczęłam m.in. pracę nad pokryciami hydrożelowymi bazującymi na poliwinylpirolidonie, opracowałam również pokrycia hydrofilowe bazujące na fosfolipidach.

Podczas studiów doktoranckich odbyłam staż naukowy w grupie prof. Seifaliana na University College London (2010). Profesor Alexander Seifalian jest współautorem ponad 500 artykułów z zakresu inżynierii biomateriałów oraz syntezy nowych polimerów do zastosowań biomedycznych. Podczas pracy w jego zespole miałam okazję nauczyć się nowych technik m.in. technik hodowli komórkowych *in vitro*, technik wytwarzania i analizy nowych biomateriałów. Był to staż, który silnie ukierunkował moją dalszą aktywność naukową – w niedługim czasie po powrocie rozpoczęłam prace własne nad zagadnieniami związanymi z wytwarzaniem bioaktywnych powłok skutkujących endotelializacją powierzchni biomateriałów. Brałam również czynny udział w powstawaniu i organizacji pierwszego na Wydziale pomieszczenia czystego do badań *in vitro*, przenosząc wiedzę zdobytą podczas stażu na jednostkę macierzystą. Niedługo przed obroną rozprawy doktorskiej udało mi się uzyskać pierwszy własny grant (Preludium, NCN), w ramach którego rozwijałam tematykę.

Po uzyskaniu stopnia doktora (2013) postawiłam sobie nowe cele badawcze. Skupiłam się na rozwoju kolejnych technologii wytwarzania powłok bioaktywnych, na które udało mi się pozyskać finansowanie w ramach kolejnego grantu (Polsko-Norweska Współpraca Badawcza, NCBiR). Zaczęłam również rozwijać tematykę związaną z technologiami wytwarzania protez naczyniowych – najpierw była to technologia oparta na procesie inwersji faz w układzie

rozpuszczalnik-nerozpuszczalnik, potem zainteresowałam się procesami wytwarzania materiałów włóknistych.

W okresie 2016-2019 miałam łącznie ponad 2-letnią przerwę w aktywności zawodowej związaną z urlopami macierzyńskimi (2016-2017 oraz 2018-2019).

W 2018 r. otrzymałam finansowanie projektu „BioGraft – Biomimetyczne protezy naczyniowe małych średnic” w ramach konkursu LIDER (NCBiR). Projekt został bardzo dobrze oceniony przez komisję konkursową i zajął wysokie, czwarte miejsce na liście projektów rekomendowanych do finansowania. Otrzymanie finansowania pozwoliło mi zintensyfikować badania nad nowymi technologiami wytwarzania protez naczyniowych. Miałam także możliwość stworzenia swojego pierwszego zespołu badawczego oraz sprawdzenia się w roli kierownika i koordynatora prac badawczych realizowanych w kilku ośrodkach. W ramach prac współpracowałam m.in. firmą konsultingową BMC Innovations (analiza zapotrzebowania rynkowego), YouNick Venture Capital (tzw. „preinkubacja” prowadzona w ramach programu BRIDGE Alfa, NCBiR), American Heart of Poland (badania przedkliniczne). W trakcie realizacji projektu wraz z Zespołem przeszliśmy od etapu idei bioaktywnej protezy wielowarstwowej (TRL1) do etapu pierwszych badań przedklinicznych opracowanych protez na modelu zwierzęcym (TRL6).

W trakcie trwania projektu rozpoczęłam współpracę z grupą badawczą z kliniki uniwersyteckiej Friedrich–Alexander University (FAU) Erlangen–Nürnberg, zajmującą się podobną tematyką. W 2022 otrzymałam stypendium wyjazdowe w ramach programu Bekker (NAWA), które umożliwiło mi odbycie stażu naukowego w Klinice, naukę nowych technik i skorzystanie z unikalnego sprzętu. Podczas pobytu analizowałam możliwość wykorzystania rozwijanych w Klinice technik hodowli w polu magnetycznym do zasiedlania protez naczyniowych opracowanych przeze mnie w ramach projektu BioGraft. Współpraca zaowocowała m.in. wspólną publikacją, otrzymaniem wspólnego projektu na kontynuację badań nad protezami naczyniowymi (OPUS-LAP, NCN, w trakcie realizacji) oraz złożeniem wspólnego wniosku na dwustronną wymianę akademicką pomiędzy zespołami (NAWA, wniosek w trakcie oceny).

Moje dalsze plany badawcze obejmują kontynuację tematyki – obecnie wraz z Zespołem przygotowujemy się do kolejnych etapów badań przedklinicznych, pierwsze implantacje nowo opracowanych protez planujemy wykonać jeszcze w tym roku. W ostatnim czasie rozpoczęłam również badania nad wykorzystaniem technik biodruku w inżynierii chemicznej i planuję rozwijać się również w tym obszarze.

4.2. Tematyka osiągnięcia naukowego

Tematyka niniejszego osiągnięcia naukowego związana jest procesami otrzymywania i modyfikacji powierzchni protez naczyniowych, które mogą być stosowane chorobach naczyń krwionośnych.

Choroby sercowo-naczyniowe charakteryzują się jednym z najwyższych wskaźników zachorowalności i śmiertelności na świecie, z szacunkową liczbą około 18 mln zgonów w ciągu ostatnich 30 lat (1). Szacuje się, że światowa roczna liczba zgonów związanych z chorobami układu krążenia wzrośnie do 2030 roku do 23 milionów (2). Do najczęstszych chorób układu krążenia należą choroba wieńcowa oraz zawał mięśnia sercowego. Schorzenia te zwykle związane są z występowaniem miażdżycy oraz jej konsekwencjami - zwężeniem i niedrożnością naczyń krwionośnych. Zabiegiem wykonywanym przy zaawansowanych zmianach w naczyniach krwionośnych jest zabieg wszczepienia tzw. bajpasu, czyli pomostowanie naczyń. W przypadku choroby niedokrwiennej serca stosuje się zabieg pomostowania tętnic wieńcowych (CABG - ang. *coronary artery bypass grafting*). Złotym standardem w procedurach pomostowania jest wykorzystanie autologicznych naczyń (tzw. autograftów), pobranych najczęściej z żyły odpiszczelowej lub tętnicy piersiowej. Problemem, który często uniemożliwia stosowanie tego rozwiązania jest ogólny zły stan zdrowia pacjenta (w szczególności mocno zaawansowana miażdżycy), co skutkuje złą kondycją wspomnianych naczyń. Na przykład wśród pacjentów wymagających pierwotnej rewaskularyzacji kończyn dolnych aż 30% nie ma odpowiedniej żyły autogennej, a w przypadku konieczności przeprowadzenia procedury wtórnej liczba ta wzrasta do 50% (3).

W takiej sytuacji alternatywą do przeszczepów autologicznych są syntetyczne protezy naczyń krwionośnych. Obecnie dostępne na rynku rozwiązania to protezy wykonane z ekspandowanego politetrafluoroetyleny (ePTFE) lub politereftalanu etyleny (PET). Są to rozwiązania, które dają dobre efekty w przypadku pomostowania dużych naczyń krwionośnych (o średnicy wewnętrznej > 6 mm). Problemem pozostaje pomostowanie naczyń małych średnic (< 6 mm). Do kategorii naczyń małych średnic zaliczają się również naczynia wieńcowe, z których większość ma średnicę poniżej 5 mm (4). Problem ten wynika z wysokiego ryzyka powstania zakrzepów wewnątrz protez, co, w połączeniu z ich małą średnicą może skutkować całkowitym brakiem drożności wewnątrz protezy. Wykazano, że stosowanie protez o średnicy wewnętrznej < 3 mm wiąże się z około 2-krotnie wyższym ryzykiem trombozy (powstawanie skrzepów) i okluzji (zamknięcie światła naczynia) w okresie okołoperacyjnym (do 30 dni od zabiegu) w porównaniu do protez o średnicy wewnętrznej z zakresu 3-6 mm (5). Dlatego też protezy, które mogłyby być stosowane jako zamienniki naczyń małych średnic muszą wykazywać się bardzo wysoką hemozgodnością. Obecnie, pomimo bardzo dużego zapotrzebowania, na rynku nie ma dostępnych tego typu rozwiązań, i jest to obszar, w którym postanowiłam skoncentrować swoje badania.

Naturalne naczynia krwionośne posiadają wiele mechanizmów zapobiegających procesom krzepnięcia krwi. Umożliwia to zachowanie prawidłowego przepływu krwi w układzie krwionośnym. Zdecydowana większość z tych mechanizmów związanych jest z działalnością endotelium, czyli monowarstwy komórek śródbłonna, która wyściela światło naczyń. Mechanizmy działania przeciwzakrzepowego śródbłonna obejmują mechanizmy

pasywne, do których należy tworzenia fizycznej bariery między krwią a prozakrzepowymi składnikami ściany naczynia (np. kolagen) oraz nadawanie powierzchni naczynia ujemnego ładunku, który „odpycha” płytki krwi (również ujemnie naładowane), zapobiegając tym samym ich osadzeniu na ścianie naczynia. Do mechanizmów aktywnych należy synteza i wydzielanie szeregu substancji regulatorowych, zarówno pro- jak i antykoagulacyjnych, które regulują procesy aktywacji i agregacji płytek krwi. W przypadku umieszczeniu w układzie krwionośnym pomostu (implantu naczyniowego) dochodzi do kontaktu krwi z syntetyczną powierzchnią, pozbawioną opisanych powyżej mechanizmów. Następuje seria zjawisk: adhezja białek osoczowych do powierzchni implantu, zmiany konformacyjne białek (ekspozycja specyficznych receptorów) oraz aktywacja i adhezja płytek krwi do nowoutworzonej warstwy białkowej. Aktywacja płytek prowadzi do zmian konformacyjnych i powstawania agregatów płytkowych. Wszystkie opisane powyżej zjawiska prowadzą do wytworzenia skrzepów krwi i ograniczenia drożności protezy. W przypadku protez małych średnic, powstanie niewielkich skrzepów może doprowadzić do całkowitego zamknięcia światła protezy lub naczynia. Jednocześnie jest to proces szybki i niebezpieczny – prowadzący do niedrożności w pierwszych dobach po zabiegu.

Polimery syntetyczne, które są obecnie badane pod kątem ich zastosowania w protezach naczyń krwionośnych w większości muszą być poddane procesom chemicznej modyfikacji powierzchni. Modyfikacja taka ma na celu wywołanie określonego efektu biologicznego oraz uniknięcie niekorzystnych zjawisk na granicy proteza-krew, opisanych powyżej.

Obecnie istnieją dwie główne strategie poprawy hemozgodności protez naczyniowych. Pierwsza z nich zakłada modyfikację powierzchni protezy, która prowadzi do ograniczenia procesów wykrzepiania krwi w kontakcie z polimerem (tzw. pokrycia biopasywne). Do tej grupy można zaliczyć rozwiązania bazujące na zmianie zwilżalności (hydrofilizacja ze względu na preferencyjną adhezję płytek krwi do powierzchni hydrofobowych), ładunku powierzchniowego (wprowadzanie ujemnego ładunku ze względu na ujemny ładunek na powierzchni płytek krwi), czy chemiczne wiązanie substancji o działaniu przeciwzakrzepowym (np. heparyna).

Druga grupa to modyfikacje, których celem jest poprawa adhezji komórek śródbłonka w celu utworzenia warstwy endotelium i zapewnienia wysokiej hemozgodności powierzchni. Endotelializacja powierzchni protez (pokrycie komórkami śródbłonka) uważana jest obecnie za najbardziej obiecującą strategię podnoszącą hemozgodność implantów naczyniowych. Jednak, aby możliwe było uzyskanie takiego efektu najczęściej konieczne jest wprowadzenie na powierzchnię protezy związków bioaktywnych (peptydy, białka) zwiększająca adhezję i proliferację komórek śródbłonka (tzw. pokrycia bioaktywne). Konieczne jest więc opracowanie procesów chemicznej modyfikacji powierzchni, które zapewnią trwałe wiązanie polimer-związek bioaktywne, jednocześnie zapewniając zachowanie bioaktywności wprowadzanego związku.

Na hemozgodność protezy, oprócz właściwości fizykochemicznych samej powierzchni, wpływają również właściwości całej protezy. Bardzo istotnym parametrem, wpływającym na efektywność pracy protezy, są właściwości mechaniczne protezy, a w szczególności jej elastyczność. Protezy powinny być wystarczająco elastyczne, aby móc wytrzymać ciśnienie fizjologiczne. Co więcej, badania wskazują, że niezgodność mechaniczna proteza-naczynie zwiększa ryzyko wystąpienia trombozy i ograniczenia drożności (6–8).

Kolejną cechą warunkującą prawidłową aktywność biologiczną jest mikrostruktura protez. Powinna ona sprzyjać wymianie składników odżywczych, eliminacji produktów przemiany materii i wzrostowi komórek. Dwa główne typy komórek budujące ściany naczyń krwionośnych: komórki śródbłonna (EC – ang. *endothelial cells*) oraz mięśni gładkich (SMC – ang. *smooth muscle cells*) funkcjonują zależnie od siebie, wydzielając substancje regulujące swój wzajemny wzrost i tempo proliferacji. Dlatego też porowatość implantu powinna zapewniać możliwość migracji składników wydzielanych przez komórki zasiedlające implant (9).

Bardzo ważnym zagadnieniem związanym z porowatością jest rozmiar porów budujących obie powierzchnie protezy – wewnętrzną i zewnętrzną. Wiele badań pokazuje, że wzrost komórek silnie zależy od chropowatości powierzchni, w przypadku materiałów włóknistych i porowatych - od średnicy włókien i porów. Charakter tej relacji zależy od typu komórek. W przypadku EC rosnących na powierzchni protez naczyniowych głównym celem jest zwiększenie adhezji i stworzenie monowarstwy na powierzchni protezy bez infiltracji materiału przez komórki. Większość badań wskazuje, że w przypadku materiałów włóknistych włókna o średnicy $<1 \mu\text{m}$ są optymalne dla wzrostu komórek śródbłonna (10). Z kolei w przypadku wzrostu SMC lepszy wzrost uzyskuje się na powierzchniach o większej chropowatości i większej średniej średnicy włókien (10). Morfologia powierzchni, w tym wielkość włókien, ma również istotny wpływ na adhezję składników krwi, zwłaszcza płytek krwi (11). Efekt ten ma kluczowe znaczenie w procesie powstawania skrzepów i okluzji protezy.

W odpowiedzi na te zróżnicowane wymagania w swoich badaniach postanowiłam skupić się na opracowaniu procesu, który umożliwiłby otrzymanie protez warstwowych, w których właściwości poszczególnych warstw są różne. Inspiracją dla takiego rozwiązania jest warstwowa budowa naczyń krwionośnych, na którą składają się trzy warstwy. Warstwa wewnętrzna, kontaktująca się z krwią, składa się z pojedynczej warstwy (monowarstwą) komórek śródbłonna oraz blaszki elastycznej – jest to forma macierzy zewnątrzkomórkowej, która charakteryzuje się zwartą strukturą i pełni funkcję błony. Warstwa środkowa złożona jest z komórek mięśni gładkich oraz wydzielanej przez nie macierzy zewnątrzkomórkowej w postaci przypadkowo ułożonych włókien kolagenu i pasm elastyny. Podstawową funkcją tej warstwy jest utrzymanie i kontrola napięcia naczyniowego oraz przenoszenie obciążeń mechanicznych powstałych podczas cyklu pracy serca. Warstwa zewnętrzna jest zbudowana z fibroblastów i wydzielanej przez nie ECM. ECM występuje w postaci włókien

kolagenowych o obwodowym ułożeniu, dzięki czemu warstwa ta jest wytrzymała na rozciąganie i stanowi główną ochronę przed pękaniem naczyń przy wysokich ciśnieniach (12).

W swoich badaniach założyłam stworzenie protezy, której ściana złożona będzie z co najmniej dwóch warstw, różniących się morfologią (np. rozmiar porów, porowatość): warstwa wewnętrzna ma zapewniać środowisko i topografię odpowiednie do odtworzenia warstwy śródbłonka, warstwa zewnętrzna ma zapewniać odpowiednie właściwości mechaniczne i porowatość umożliwiającą wrastanie naczyń włosowatych i rozwój SMC. Jednocześnie zdecydowałam się na stworzenie protez z materiału włóknistego, którego właściwości mechaniczne mogą być kontrolowane poprzez odpowiedni dobór parametrów procesu wytwarzania.

Jako materiał bazowy w swoich pracach zdecydowałam się na wykorzystanie poliuretanów (PU). Jest to dość zróżnicowana chemicznie grupa polimerów, które są często badane w kontekście zastosowań biomedycznych (zastawki serca, implanty chrząstki, skóry, naczyń krwionośnych i kości). Ogromną zaletą PU w kontekście zastosowań w inżynierii naczyń krwionośnych jest zdecydowanie lepsze dopasowanie mechaniczne z naturalnymi naczyniami w porównaniu do polimerów, które najczęściej są wykorzystywane do produkcji protez naczyniowych dużych średnic - PET i ePTFE. Ponadto poliuretany są bardziej podatne na modyfikacje chemiczne w porównaniu do PET i ePTFE, co daje większe możliwości poprawy ich właściwości powierzchniowych poprzez zastosowanie odpowiednich pokryć modyfikujących.

Jedną z najczęściej badanych i stosowanych metod otrzymywania materiałów włóknistych jest elektroprzędzenie (ES – ang. *electrospinning*). Metodą tą otrzymano np. protezy naczyniowe z kwasu polimlekowego (13), polikaprolaktonu (14) czy ich kopolimeru (15). W mojej pracy badawczej do otrzymywania warstwowych protez naczyniowych proponuję technikę alternatywną – rozdmuch roztworu polimeru (SBS – ang. *solution blow spinning*). Dotychczas SBS z powodzeniem był wykorzystywany w inżynierii biomedycznej, m.in. do otrzymywania materiałów antybakteryjnych (16), w szczególności opatrunków (17). Jednocześnie istnieje niewiele doniesień dotyczących wykorzystania SBS w produkcji protez naczyniowych. Pimenta et al. wykorzystał system SBS do produkcji jednowarstwowych protez naczyniowych z PCL (18). Akentjew et al. zaproponował kombinację SBS z techniką dip-spinning otrzymując dwuwarstwowe, biomimetyczne protezy wytworzone z PCL oraz żelu zawierającego komórki (19). Brakuje doniesień opisujących wykorzystanie tej metody do otrzymywania protez naczyniowych z poliuretanów. Opracowanie procesu wytwarzania warstwowych protez włóknistych, metod chemicznej modyfikacji powierzchni poliuretanów oraz charakterystykę otrzymanych struktur i pokryć prezentuję w niniejszym osiągnięciu naukowym.

4.3. Założony cel badawczy

Założonym celem prowadzonych przeze mnie prac było opracowanie technologii otrzymywania i modyfikacji poliuretanowych implantów mogących znaleźć zastosowanie jako protezy naczyniowe małych średnic.

Założony cel realizowałam kilkietapowo. Badania rozpoczęłam od opracowania metod modyfikacji chemicznej poliuretanów, które umożliwiłyby poprawę ich hemozgodności (**H1-H5**). Następnie skupiłam się na procesach wytwarzania poliuretanowych protez naczyniowych (**H6-H8**). Wybrane techniki modyfikacji zastosowałam do modyfikacji luminalnej powierzchni wytworzonych protez (**H9, H10, H11**).

Prowadzone przeze mnie badania można więc podzielić na **obszary tematyczne**:

1. procesy chemicznej modyfikacji powierzchni poliuretanów prowadzące do wytworzenia powłok określonym efekcie biologicznym
2. technologie wytwarzania poliuretanowych protez naczyniowych o założonych właściwościach fizyko-chemicznych

We wszystkich prezentowanych pracach jako materiał bazowy stosowałam poli(węglano-uretany). Poliuretany te ze względu na obecność grup węglanowych charakteryzują się wyższą biostabilnością w porównaniu do poli(etero-uretanów), jednocześnie wykazując bardzo dobre właściwości w kontakcie z krwią – są biozgodne i atrombogeniczne. Badania prowadziłam na poli(węglano-uretanach) medycznych, które są już z powodzeniem stosowane do wytwarzania implantów o bezpośrednim kontakcie z krwią – np. do otrzymywania protez wspomagania pracy serca. Jedna praca (H1) prezentuje wyniki otrzymane dla poliuretanów Chronathane (CardioMat). Pozostałe badania prowadzone były na poliuretanach ChronoFlex (AdvanSourceBiomaterials, USA) przy czym, w zależności od zastosowanej techniki, korzystałam z poliuretanów różniących się stopniem twardości w skali Shore'a (75A, 45D, 75D).

4.4. Procesy chemicznej modyfikacji powierzchni poliuretanów

Projektując opisywane poniżej procesy modyfikacji chemicznej brałam pod uwagę geometrię potencjalnego materiału docelowego, czyli cylindrycznych protez naczyniowych. Jak już wspominałam, pokrycia te mają modyfikować powierzchnię, która kontaktuje się z krwią, a więc powierzchnię wewnętrzną (luminalną) protezy. W takim przypadku wykorzystanie niektórych technik, często stosowanych w procesach modyfikacji, tj. szczerpienie UV lub techniki plazmowe, wydaje się być mniej zasadne. Mam tu na myśli trudności techniczne w przeprowadzeniu takiego procesu wewnątrz materiału cylindrycznego. Współpracując z zespołem prof. Fiedorowicza (WAT) nad zagadnieniami dotyczącymi modyfikacji polimerów promieniowaniem E-UV kilkakrotnie prowadziliśmy dyskusję na temat możliwości skonstruowania układu umożliwiającego właśnie modyfikację wnętrza cylindrów za pomocą tej techniki. Znane są mi również próby podejmowane przez innych

badaczy polegające na „przeciąganiu” protezy stroną wewnętrzną na zewnątrz, przeprowadzanie modyfikacji, a następnie ponowne „przeciąganie” protezy. Ostatecznie, po rozważeniu wszystkich zalet i wad konkretnych metod postanowiłam skupić się w swoich pracach na procesach zanurzeniowych. Procesy takie mogą być docelowo przeprowadzone na protezach umieszczonych w układach przepływowych, gdzie roztwór modyfikujący przepływa przez protezę modyfikując jej powierzchnię wewnętrzną. Analizę skuteczności takiego rozwiązania dla modyfikacji polikarylanami przedstawiłam w pracy **H9**. Badania takie przeprowadzałam również z powodzeniem dla metody modyfikacji opartej na silanizacji (patent **H11**). Możliwe jest również blokowanie końca protezy i umieszczanie roztworu modyfikującego w jej wnętrzu – rozwiązanie zastosowane w pracy **H10**.

W ramach przeprowadzonych badań opracowałam trzy technologie chemicznej modyfikacji powierzchni poliuretanów: pokrycia hydrożelowe oparte na zmodyfikowanej reakcji Fentona (**H1-H2**) oraz pokrycia peptydowe oparte na silanizacji powierzchni (**H3**) lub polimeryzacji kwasu akrylowego (**H4-H5**). Wszystkie opracowane metody są metodami nowymi, zgodnie z moją wiedzą nie były wcześniej prezentowane w literaturze.

W pracy **H1** zaproponowałam nową metodę chemicznej modyfikacji poliuretanów, która prowadzi do usieciowania wodnego roztworu PVP przy jego jednoczesnym związaniu z powierzchnią poliuretanu. W pracy opisuję mechanizm reakcji oraz przedstawiam podstawowe właściwości pokryć.

Moim celem było otrzymanie pokrycia, które skutkować będzie obniżeniem adhezji płytek krwi. Zwilżalność powierzchni jest jedną z cech, która silnie warunkuje adsorpcję białek i adhezję komórek. Poliuretany z którymi pracuję wykazują zwilżalność z zakresu 70-90°. Postanowiłam, zbadać jak na ich właściwości biologiczne wpłynie zwiększenie zwilżalności poprzez wprowadzenie warstwy hydrożelowej. W prezentowanych badaniach polimerem modyfikującym, użytym do wytworzenia struktury hydrożelu jest poliwinylpirolidon (PVP). PVP wykazuje wysoką biokompatybilność (20–22) i działanie antybakteryjne (23,24). Jest polimerem odpornym na hydrolizę, co umożliwia jego aplikacje w kontakcie z silnie hydrolitycznym środowiskiem jakim jest krew. Olbrzymią zaletą PVP jest jego wysoka hemokompatybilność – dodatek PVP do biomateriałów może prowadzić do zmniejszenia hemolizy erytrocytów (25), zmniejszenia adsorpcji albuminy (26), fibronektyny (27) i fibrynogenu (28) do powierzchni biomateriału.

W prezentowanym procesie powłoka hydrożelowa powstaje na skutek reakcji wolnorodnikowej. Zastosowałam zmodyfikowaną reakcję Fentona, w której źródłem wolnych rodników jest reakcja redox pomiędzy wodoronadtlenkiem kumenu (CHP – ang. *cumene hydroxyperoxide*) oraz jonami żelaza (II), prowadząca do wytworzenia wolnych rodników (Rys.1, reakcja 1). Część wolnych rodników może reagować z cząsteczkami wody, co prowadzi do utworzenia wysoko reaktywnych rodników hydroksylowych (Rys.1, reakcja 3). Pod wpływem wolnych rodników obecnych w układzie dochodzi do wytworzenia makrorodników

na łańcuchach polimerów obecnych w układzie – PU oraz PVP (Rys.1, reakcja 4) a następnie utworzenia wiązań chemicznych pomiędzy nimi (Rys.1, reakcja 5). Dodatkowo, obecny w układzie czynnik sieciujący – dimetakrylan glikolu etylenowego (EGDMA – ang. *ethylene glycol dimethylacrylate*) umożliwia proces sieciowania PVP, co prowadzi do utworzenia struktury hydrożelu. Należy wspomnieć, że w układzie możliwe są jeszcze reakcje poboczne powstałych rodników zarówno z jonami Fe^{2+} jak i Fe^{3+} , co zmniejsza efektywność procesu modyfikacji poprzez „zużycie” rodników oraz jonów Fe^{2+} (Rys.2, reakcje 6 i 7).

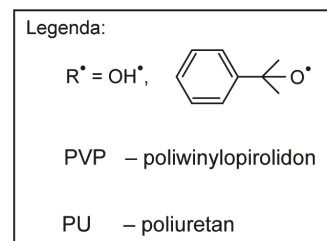
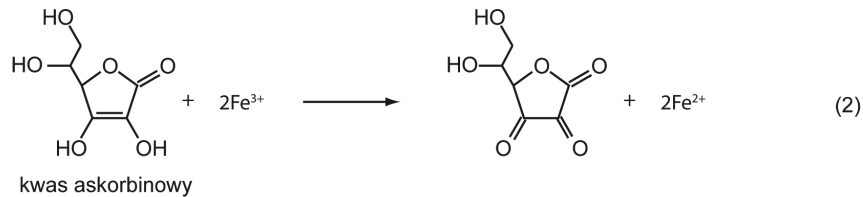
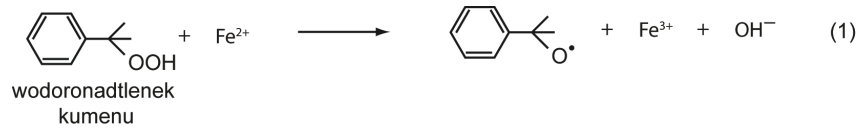
W opisywanym procesie zastosowałam rozwiązania, które zwiększają efektywność wytwarzania warstwy hydrożelowej.

Przede wszystkim zaproponowana przeze mnie technologia prowadzenia reakcji modyfikacji jest procesem dwuetapowym, w którym reagenty konieczne do wytworzenia pokrycia są rozdzielone przestrzennie i czasowo (Rys.3). Pierwszy etap to zanurzenie materiału modyfikowanego w roztworze zawierającym CHP oraz EGDMA. Na tym etapie dochodzi do adsorpcji tych reagentów na powierzchni polimeru. Drugi etap to zanurzenie polimeru z zaadsorbowanymi CHP i EGDMA w wodnym roztworze zawierającym PVP, AA oraz jony Fe^{2+} . W tym momencie dochodzi do wytworzenia wolnych rodników i zachodzą kolejno opisane powyżej reakcje. Zdecydowałam się na zmodyfikowanie klasycznej reakcji Fentona (przebiegającej między jonami Fe^{2+} oraz nadtlenkiem wodoru) i zastosowanie zamiast H_2O_2 wodoronadtlenku kumenu. Zarówno CHP, jak i EGDMA są związkami słabo rozpuszczalnymi w środowisku wodnym. W omawianym rozwiązaniu jest to korzystne – podczas drugiego etapu reakcji (roztwór wodny) związki te pozostają zaadsorbowane na powierzchni PU, a tylko nieznaczna ich część ulega rozpuszczeniu w wodzie i dyfunduje w głąb fazy wodnej. Takie rozwiązanie wymusza przebieg reakcji rozkładu CHP i wytworzenia wolnych rodników głównie na powierzchni międzyfazowej, co z kolei prowadzi do nierównomiernego rozkładu powstających wolnych rodników - wyższego przy granicy międzyfazowej PU/roztwór modyfikujący, niższego w głębi roztworu modyfikującego. Skutkuje to skupieniem przestrzennym reakcji wolnorodnikowych na granicy międzyfazowej i wspomaga tworzenie wiązań PU-PVP (Rys. 4).

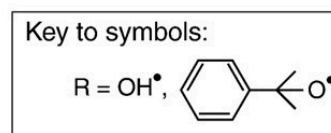
Rozwiązaniem zwiększającym efektywność procesu, które zaproponowałam jest również dodatek antyutleniacza – kwasu askorbinowego (AA – ang. *ascorbic acid*). AA redukuje jony Fe^{3+} powstałe w wyniku reakcji z CHP i tym samym dostarcza nowe jony Fe^{2+} potrzebne do kolejnych reakcji z CHP (Rys.1, reakcja 2).

Przeprowadzone przeze mnie próby kontrolne dowiodły, że omawianym procesie główną rolę odgrywają wolne rodniki wytwarzane wskutek dekompozycji CHP. Proces przeprowadzona przy użyciu takich samych roztworów, ale bez obecności CHP skutkowało widocznym makroskopowo brakiem powłoki hydrożelowej. Kolejna próba kontrolna – stosowanie tych samych roztworów modyfikujących, ale bez obecności EGDMA – wykazały, że dochodzi do utworzenia warstwy hydrożelowej (powstanie rodników i makrorodników

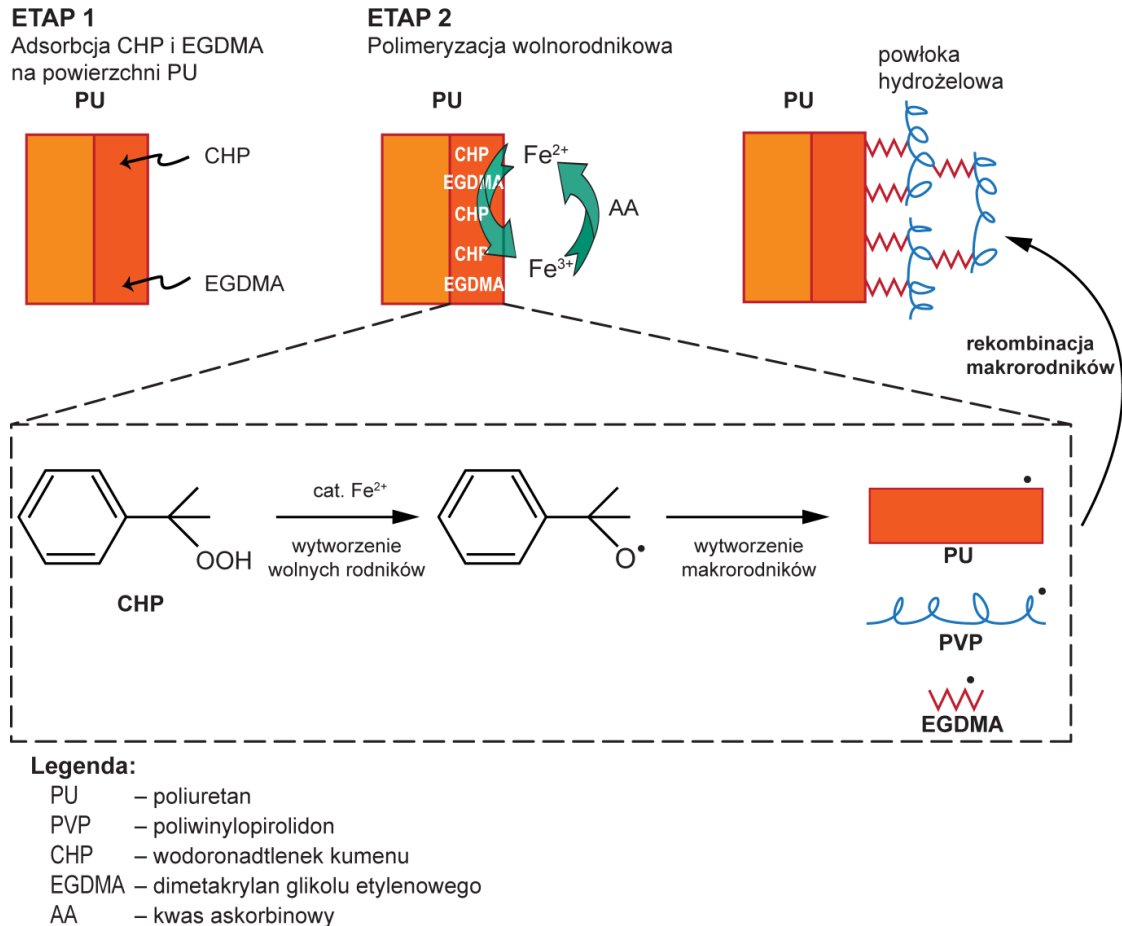
skutkujące wiązaniem łańcuchów polimerowych), ale zachodzi zdecydowanie wolniej. Dowodzi to, że EGDMA pełni funkcję zgodną z założeniami – bierze udział w reakcjach rodnikowych i intensyfikuje proces formowania żelu.



Rys.1: Reakcje wolnorodnikowe prowadzące do wytworzenia powłok hydrożelowych na powierzchni poliuretanu.

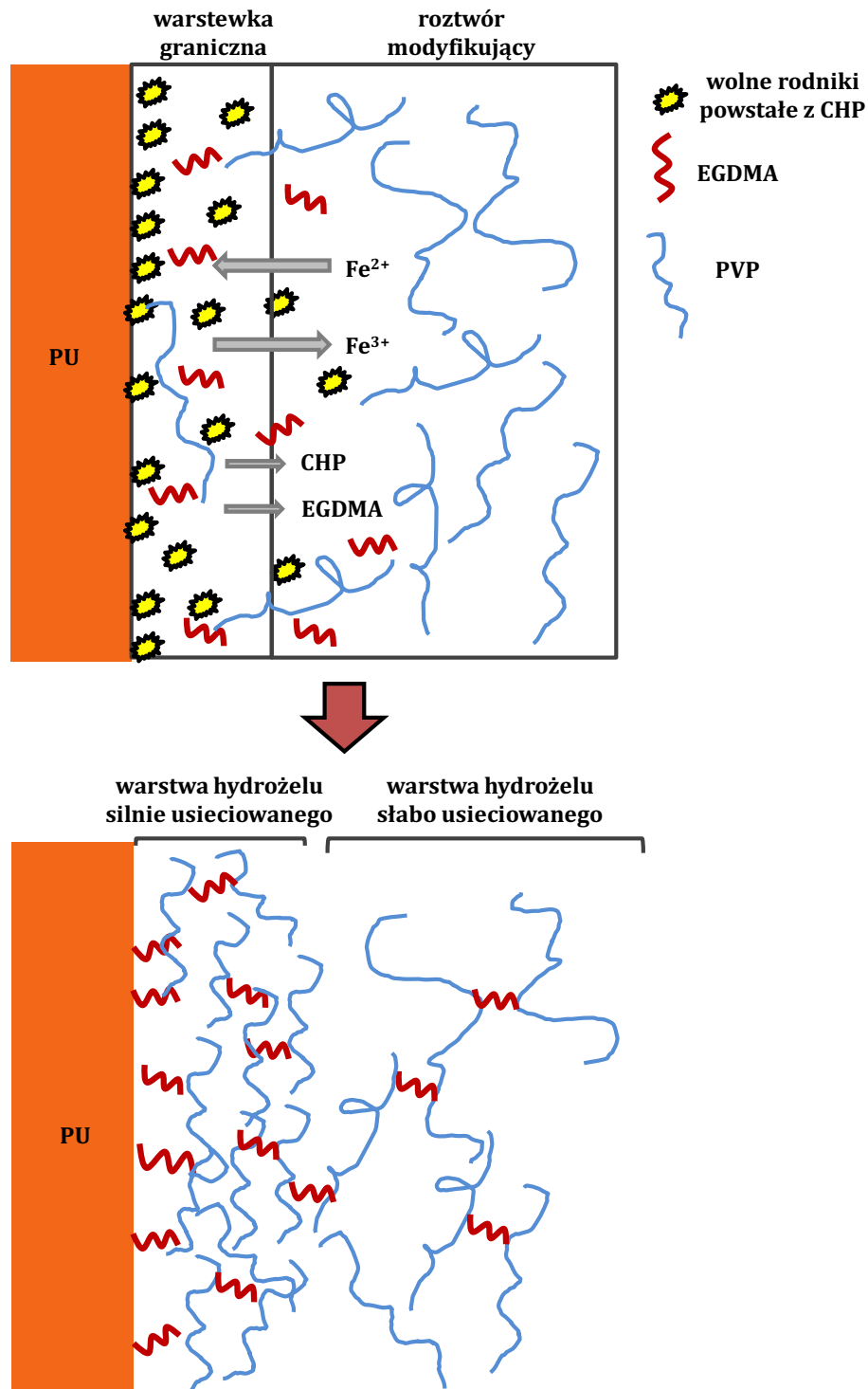


Rys.2: Zachodzące w układzie reakcje poboczne.



Rys. 3: Dwuetapowy proces modyfikacji: (1) dyfuzja reagentów i ich adsorbpcja na granicy międzyfazowej, (2) reakcje redox prowadzące do wytworzenia rodników i powstania powłoki hydrożelowej związanej chemicznie z polimerowym podłożem.

W pracy zbadalam wpływ stężeń reagentów (FeCl_2 , CHP, EGDMA, PVP) na podstawowe właściwości fizyczne utworzonych powłok: masa powstałego hydrożelu (HG, g/m²) oraz jego uwodnienie (EWC, %). Badania prowadziłam dla dwóch mas molowych PVP: 24 oraz 360 kDa. Ciekawą zależność uzyskałam dla analizy wpływu stężenia jonów Fe^{2+} . Dla niskich stężeń Fe^{2+} wartości ESR oraz HG rosły wraz ze wzrostem stężenia Fe^{2+} . Jednak dalszy wzrost stężenia Fe^{2+} (powyżej 0,1% wag.) nie jest korzystny dla procesu – wartości HG oraz ESR zmniejszają się. Wnioskowałam, że wysokie stężenie jonów Fe^{2+} skutkuje dużym stężeniem wolnych rodników w pobliżu granicy faz, co z kolei prowadzi do powstawania cienkich i silnie usieciowanych powłok. Innym możliwym wyjaśnieniem może być efekt reakcji pobocznych (Rys.2, reakcje 6–7). Reakcje 3–5 konkurują z reakcjami między rodnikami a jonami żelaza (reakcje 6–7). Ta konkurencja prowadzi do bezproduktywnego rozkładu CHP i ogranicza liczbę wiązań między PU i PVP. Wykazałam również spadek efektywności procesu dla stężenia PVP powyżej 15% wag. Możliwym wytłumaczeniem jest spowolniony proces dyfuzji reagentów do powierzchni międzyfazowej spowodowany wysokimi gęstościami roztworu PVP.



Rys.4: Dyfuzja reagentów w omawianym układzie: niska rozpuszczalność CHP i EGDMA w fazie wodnej ogranicza ich dyfuzję w głąb fazy wodnej (etap 2 procesu), wymuszając przebieg reakcji rozkładu CHP głównie na powierzchni międzyfazowej PU/roztwór modyfikujący. Skutkuje to zróżnicowaniem w usieciowaniu powstałej struktury hydrożelu (silniejszym od strony PU) oraz dobrym związaniem PU-PVP.

Biorąc pod uwagę potencjalne zastosowanie powłoki zbadalam wpływ pokrycia hydrożelowego z PVP na aktywację i agregację płytek krwi. Badanie to wykonano przy współpracy z grupą prof. Sanaka z Uniwersytetu Jagiellońskiego. W badaniu wykorzystano urządzenie ImpactR, umożliwiające kontakt materiału z krwią w warunkach dynamicznych poprzez zadanie stałej wartości siły ścinającej, typowej dla układu krążenia. Zespół prof. Sanaka z powodzeniem stosuje ImpactR do oceny hemozgodności różnych powierzchni (29). Zaletą tego rozwiązania jest praca na małych objętościach krwi, w przeciwieństwie do systemów przepływowych, wymagających większych objętości krwi. Po kontakcie krwi z materiałem krew poddawana jest analizie cytometrycznej. Aktywacja płytek krwi określana była poprzez wyznaczenie % płytek krwi CD62P-pozytywnych i PAC-1-pozytywnych.

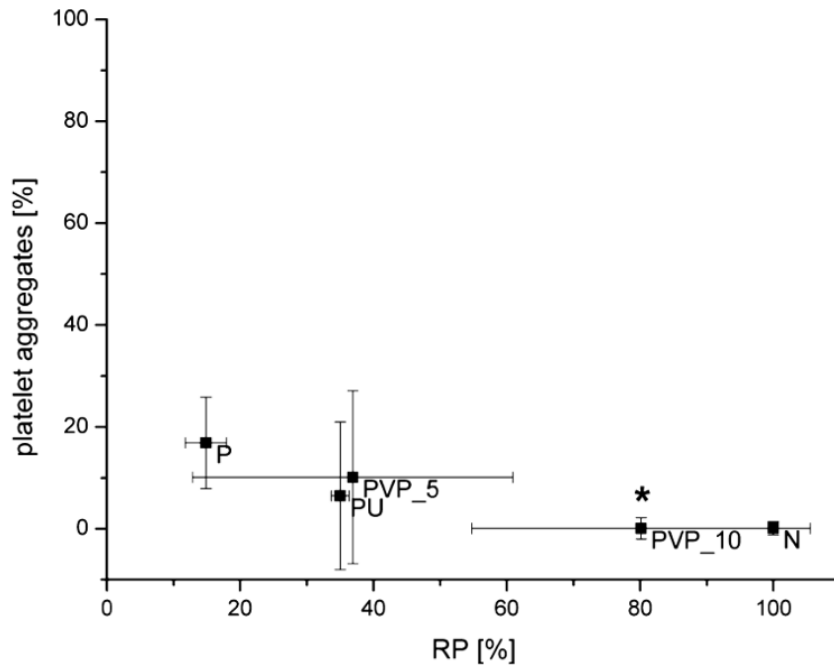
Jeden z badanych parametrów - ubytek wolnych płytek krwi (*platelet consumption*), przedstawia odsetek płytek krwi, które uległy agregacji lub adhezji do badanego materiału. Jest to bardzo istotny parametr przy badaniu hemozgodności powierzchni – oczekuje się, że w przypadku powierzchni hemozgodnej, nie powodującej adhezji płytek krwi wartość ta będzie niska (niski ubytek wolnych płytek krwi oznacza, że większość płytek pozostaje w stanie fizjologicznym, niezwiązanych). Wykazałam istotne różnice pomiędzy PU niemodyfikowanym, a PU pokrytym powłoką hydrożelową (PU-PVP). W przypadku PU w przybliżeniu połowa płytek krwi uległa agregacji lub adhezji do podłoża. Z kolei dla materiału PU-PVP wartość ta wynosiła < 10%, świadcząc o znaczącej poprawie hemozgodności PU modyfikowanego powłoką hydrożelową.

W pracy **H2** dokładniej analizuję wpływ pokrycia hydrożelowego na odpowiedź komórkową *in vitro* oraz *in vivo*. Wykazałam istotne zmniejszenie ilości fibrynogenu zaadsorbowanego do powierzchni pokrytej hydrożelem PVP (około dwukrotne w stosunku do PU niemodyfikowanego). Dwa badane warianty pokrycia (PVP_5 oraz PVP_10), różniące się stężeniem PVP (% wag.) w roztworze modyfikującym, uzyskały wynik zbliżony. Istotne różnice ujawniły się w analizie dynamicznej – wykazałam, że stężenie PVP zastosowane w roztworze modyfikującym wpływało na hemozgodność otrzymanych pokryć.

Wyniki pokazały, że PVP_10 cechuje się istotnie wyższą hemozgodnością w porównaniu do PU niemodyfikowanego – zarówno jeśli chodzi o odsetek wolnych płytek krwi pozostałych w próbce po kontakcie z materiałem, jak i odsetek płytek tworzących agregaty. Z kolei wariant PVP_5 wykazywał właściwości zbliżone do PU. Wnioskowałam, że główną przyczyną tej różnicy były istotnie różne właściwości fizyczne analizowanych pokryć (grubość wytworzonej powłoki, masa przyłączonego hydrożelu oraz jego uwodnienie), które oczywiście zależne były od stężenia PVP w roztworze modyfikującym.

W pracy przedstawiono również wyniki pierwszych testów biozgodności materiału *in vivo*. Badany materiał był implantowany podskórnym (królik nowozelandzki) na 7,14 oraz 30 dni. Proces gojenia rany przebiegał prawidłowo, parametry krwi pozostawały w normie przez cały okres badania. Po zadanym okresie implantacji pobierano wycinku głównych narządów i

analizowano histopatologicznie. Analizowane tkanki wykazywały prawidłową morfologię, nie stwierdzono również odpowiedzi zapalnej w okolicy miejsca implantacji, potwierdzono tym samym biogodność badanego pokrycia hydrożelowego.



Rys.5: Ranking hemozgodności analizowanych materiałów: zależność odsetka wolnych płytek krwi (RP) od odsetka agregatów płytkowych obecnych w próbkach krwi po kontakcie z badanym materiałem w warunkach dynamicznych. Materiały o wysokiej hemozgodności zajmują obszar w prawym dolnym rogu (wysokie wartości wolnych płytek krwi, niskie wartości agregatów płytkowych), natomiast niskiej – lewy górny. Najlepsze wartości uzyskano dla polimeru modyfikowanego 10% roztworem PVP (PVP_10).

Metoda wytwarzania pokryć hydrożelowych na powierzchni polimeru została opatentowana (**Pat1**: T. Ciach, B. Butruk, „Sposób otrzymywania wyrobów polimerowych pokrytych warstwą innego polimeru”, 2013), a niedawno udzielono licencji podmiotowi zewnętrznemu na jej stosowanie w wyrobach medycznych.

Równoległe z pracami nad powłokami biopasywnymi rozpoczęłam prace nad bioaktywnymi modyfikacjami powierzchni poliuretanowych. Badania te w dużej części przeprowadziłam w ramach dwóch grantów, których byłam kierownikiem: Preludium (NCN) i Polsko-Norweska Współpraca Badawcza (NCBiR).

Moim celem było stworzenie powierzchni, która umożliwiłaby prawidłowy rozwój komórek śródbłonna i utworzenie monowarstwy komórek, podobnie jak ma to miejsce wewnątrz naczyń krwionośnych w warunkach fizjologicznych. Powierzchnia poliuretanów, podobnie jak większości polimerów syntetycznych, nie jest środowiskiem sprzyjającym adhezji komórek. W celu zwiększenia adhezji komórkowej musi być podana modyfikacjom fizycznym

badź chemicznym. Jednocześnie, wprowadzona modyfikacja powinna być rozwiązaniem selektywnym – tzn. promować adhezję wybranego typu komórek (w omawianym przypadku komórek śródbłonna), bez zwiększania adhezji innych typów komórek. W szczególności niepożądana jest zwiększona adhezja płytek krwi (aktywacja płytek i powstawanie agregatów płytkowych) oraz komórek mięśni gładkich (nadmierna proliferacja prowadząca do zwężenia światła protezy).

Rozpoczęłam poszukiwania biomolekuły, która spełniałaby te założenia. W wielu pracach, również skupiających się na endotelializacji implantów sercowo-naczyniowych, wykorzystuje się peptydy zawierające sekwencję RGD (30–35). Jest to popularna i uniwersalna sekwencja zwiększająca adhezję różnych typów komórek. W mojej ocenie nie jest to jednak sekwencja, która powinna być stosowana do modyfikacji powierzchni protez naczyniowych, właśnie ze względu na brak selektywności. Wykazano, że sekwencja ta zwiększa co prawda adhezję EC, ale jej wprowadzenie na powierzchnię materiału również istotnie zwiększa adhezję płytek krwi (36), co, jak już wielokrotnie podkreślałam, jest zjawiskiem niekorzystnym.

Analiza literatury sugerowała, że molekułą selektywną dla komórek śródbłonna mogą być peptydy zawierające sekwencję aminokwasową REDV. Zdecydowałam się na skupienie swoich badań na tej sekwencji. We wszystkich pracach stosowałam peptydy zawierające sekwencje REDV oraz tzw. sekwencje flankowe na obu końcach łańcucha peptydowego, złożone z trzech aminokwasów GSG. Glicyna (G) i seryna (S) to aminokwasy często stosowane w sekwencjach flankowych ze względu na prostą budowę chemiczną i neutralny efekt biologiczny. Założyłam, że obecność wspomnianych sekwencji flankowych na końcach łańcucha peptydowego będzie korzystna i wspomogą przyjęcie natywnej konformacji przez sekwencję analizowaną - REDV. Peptyd analizowany w moich badaniach składał się więc z 10 aminokwasów tworzących sekwencję GSGREDVGSG.

Kolejnym krokiem po wyborze sekwencji było opracowanie metod jej chemicznego przyłączania do powierzchni poliuretanu. Badania pokazują, że bezpośrednie przyłączanie biomolekuł do powierzchni polimerów może znacząco obniżyć ich aktywność biologiczną (37). Założyłam, że korzystniejszym rozwiązaniem będzie przyłączenie peptydu do polimeru za pomocą cząsteczki łącznikowej, tzw. linkera, która zapewni mu zachowanie natywnej konformacji i tym samym, aktywności biologicznej. Plan zakładał więc opracowanie kilkuetapowego procesu: (1) aktywacja powierzchni PU, (2) przyłączenie linkera, (3) przyłączenie peptydu. Moje badania skutkowały opracowaniem dwóch technologii przyłączania peptydu do powierzchni poliuretanu różniące się zastosowanym linkerem: pierwsza metoda oparta jest na silanizacji powierzchni (**H3**), druga polimeryzacji kwasu akrylowego (**H4-H5**).

W pracy **H3** zaproponowałam metodykę modyfikacji PU z wykorzystaniem silanów. Jest to kilkuetapowy proces prowadzący do przyłączenia peptydu. Mechanizm procesu modyfikacji wraz z opisem reakcji zachodzących na każdym etapie przedstawiłam na Rys.6.

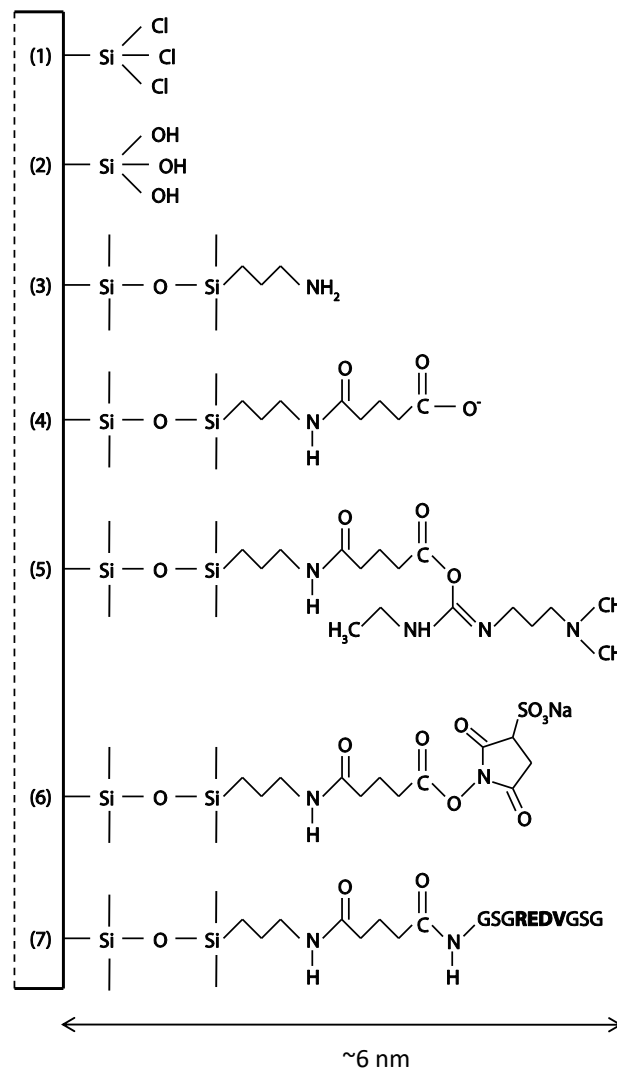
Ponieważ poliuretany nie posiadają żadnych reaktywnych grup funkcyjnych w pierwszym etapie konieczna była aktywacja powierzchni, którą przeprowadziłam za pomocą silanizacji czterochlorkiem krzemu (STC). Następnie przeprowadziłam hydrolizę, czego efektem było utworzenie grup silanolowych na powierzchni PU. W kolejnym etapie przyłączyłam cząsteczkę łącznikową (*linker*) - 3-aminopropylotrietoksylsilan (APTES), który hydrolizuje w środowisku wodnym i tworzy wiązania wodorowe z wcześniej utworzonymi grupami silanolowymi na powierzchni PU. Na tym etapie na powierzchni materiały powinny znajdować się grupy aminowe pochodzące od cząsteczek APTES. Aby przeprowadzić przyłączanie peptydu konieczna jest obecność grup karboksylowych – przeprowadziłam więc reakcję karboksylacji grup aminowych bezwodnikiem glutarowym, co skutkowało pojawieniem się powierzchniowych grup COOH.

Przyłączanie peptydu przeprowadziłam za pomocą znanego protokołu wiązania grup aminowych z karboksylowymi w obecności aktywatorów sulfoNHS i EDC (38). Aby zintensyfikować reakcje wiązania peptydu do powierzchni polimeru i ograniczyć reakcje sieciowania peptydów (wskutek reakcji grup COOH i NH₂ między łańcuchami peptydowymi) proces prowadziłam dwuetapowo: najpierw aktywując grupy COOH na powierzchni PU, a następnie dodając sam peptyd.

Na etapie badań wstępnych dobrałam odpowiednie stężenia APTES oraz bezwodnika. Efekt danej reakcji – powstanie powierzchniowych grup aminowych lub karboksylowych analizowałam metodami kolorymetrycznymi. Opracowałam protokoły oznaczania grup COOH/NH₂, które umożliwiły oszacowanie ich gęstości powierzchniowej. Wykazałam, że najwyższe stężenie powierzchniowych grup aminowych (oznaczanych za pomocą barwnika kationowego – oranżu akrydyny) uzyskano po przyłączeniu linkera (grupy aminowe obecne na cząsteczkach APTES). Po kolejnym etapie procesu modyfikacji liczba grup aminowych spada, potwierdzając poprawne zajście procesu karboksylacji. Z kolei najwyższa liczba grup karboksylowych (oznaczanych za pomocą barwnika anionowego – błękitu toluidyny) charakteryzuje powierzchnie po karboksylacji. Liczba grup COOH spada po kolejnym etapie – potwierdzając poprawną aktywację grup COOH poprzez przyłączenie sulfoNHS.

W kolejnych etapach prac skupiłam się na ocenie efektu biologicznego (adhezja EC, płytek krwi, adsorpcja fibrynogenu) wprowadzonej modyfikacji. Wykazałam istotną różnicę między powierzchnią modyfikowaną a powierzchnią niemodyfikowaną (PU) potwierdzając korzystny wpływ przeprowadzonej modyfikacji na właściwości biologiczne: obniżenie adsorpcji fibrynogenu, zwiększenie adhezji EC). Jako że celem moich badań była m.in. analiza wpływu peptydu REDV na odpowiedź biologiczną wprowadziłam do badań dodatkową kontrolę materiałową – materiał poddany opisanej powyżej procedurze modyfikacji, różniący się tym, że na ostatnim etapie zamiast peptydu REDV przyłączałam silnie hydrofilową cząsteczkę TRIS (ang. *tris(hydroxymethyl)aminomethane*). Analiza efektów biologicznych wykazała, że zarówno adsorpcja fibrynogenu jak i adhezja EC są na zbliżonym poziomie

zarówno dla PU_RED V jak i PU_TRIS. Taki wynik sugeruje, że obserwowany efekt biologiczny jest głównie skutkiem hydrofilizacji powierzchni i wprowadzenia powierzchniowych grup karboksylowych. Jest to efekt nie tyle silny, że pojawienie się na powierzchni peptydu nie skutkuje już dalszym wzmocnieniem adhezji komórkowej. Podsumowując, przeprowadzony proces silanizacji powierzchni skutkowało pożądanym efektem biologicznym. Jednak, z uwagi na fakt, że opracowana metoda była procesem wieloetapowym, postanowiłam kontynuować pracę nad pokryciami peptydowymi i opracować inną metodę wiązania peptydu do powierzchni PU.



Rys. 6: Kolejne etapy procesu chemicznego związania peptydu z powierzchnią PU z wykorzystaniem silanizacji: (1) aktywacja PU poprzez reakcję z czterochlorkiem krzemu (STC), (2) hydroliza STC z wytworzeniem grup silanolowych, (3) wprowadzenie cząsteczki łącznikowej z terminalnymi grupami aminowymi (4) karboksylacja powierzchni poprzez reakcję z bezwodnikiem glutarowym, (5) i (6) aktywacja grup karboksylowych poprzez reakcję z EDC i sulfoNHS, (7) przyłączenie peptydu.

Metodę taką prezentuję w pracach **H4** i **H5**. Jest to metoda wiązania chemicznego peptydu, w której cząsteczką łącznikową jest kwas akrylowy (AA, ang. *acrylic acid*). W pracy H4 opisuję mechanizm reakcji oraz badam wpływ parametrów procesowych (czas, temperatura, stężenie kwasu akrylowego) na właściwości pokrycia. Mechanizm reakcji opiera się na szczepieniu AA do powierzchni PU poprzez polimeryzację rodnikową indukowaną redukcją jonów Ce^{4+} (Rys. 7). W środowisku kwaśnym inicjator cerowy oddziela wodór od grup uretanowych obecnych w PU, wytwarzając wolne rodniki na atomach azotu, które następnie reagują z AA. Wybór AA jako związku łącznikowego podyktowany był jego dobrze udokumentowaną biogodnością. Przyłączenie AA wprowadza na powierzchnię grupy karboksylowe, do których w kolejnym etapie można przyłączyć peptyd stosując opisaną wcześniej reakcję z wykorzystaniem sulfoNHS/EDC.

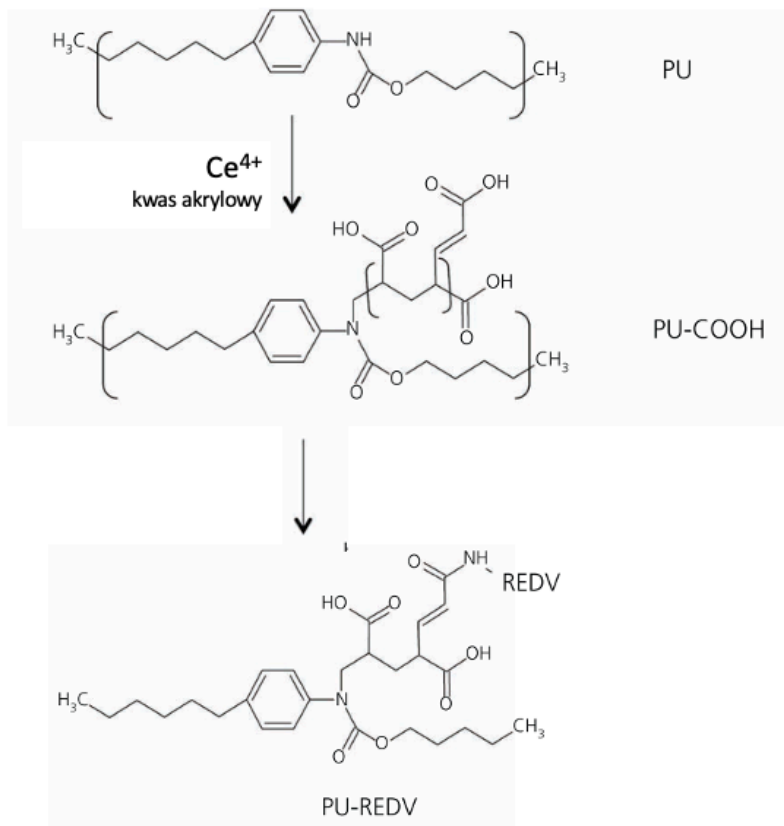
Podobną metodę szczepienia AA opisano w literaturze dla modyfikacji chitozanu (39) lub PET (40). Co istotne, w pracach tych utrzymuje się, że do pomyślnej realizacji tego podejścia wymagane są powierzchniowe grupy -OH. W przeciwieństwie do tego stwierdzenia, przedstawiam metodę skutecznego wprowadzenia AA na powierzchnię PU z pominięciem etapu hydroksylacji powierzchni. Przeprowadzone przeze mnie badania wstępne wykazały, że proces prowadzony na hydroksylovanym PU (fotooksydacja UV) skutkował zbliżoną efektywnością wiązania AA.

Poprawne zajście obu etapów modyfikacji potwierdziłam analizą spektroskopową powierzchni (XPS). Wykazałam, że wprowadzenie AA na powierzchnie skutkuje wzrostem udziału % tlenu i obniżeniem udziału % azotu, co związane jest z wprowadzeniem na powierzchnię grup karboksylowych. W kolejnym etapie procesu (przyłączenie peptydu) dochodzi do wzrostu udziału % azotu (grupy aminowe obecne we wprowadzanym peptydzie).

Stosując opracowaną wcześniej metodykę wyznaczania gęstości powierzchniowej grup COOH zbadalam zależność pomiędzy tą wartością a czasem reakcji, temperaturą oraz stężeniem kwasu akrylowego w roztworze modyfikującym. Wykazałam, że dla 1% i 3% stężenia AA gęstość powierzchniowa wprowadzonych grup COOH wzrasta wraz z wydłużeniem czasu reakcji oraz wzrostem temperatury reakcji. Wartość ta wzrasta również wraz ze wzrostem stężenia AA w roztworze modyfikującym.

W pracy **H5** skupiam się na ocenie efektu biologicznego opracowanej modyfikacji. Wykazałam, że proces modyfikacji skutkował hydrofilizacją powierzchni (wartości kąta zwilżania malały wraz ze wzrostem stężenia AA w roztworze modyfikującym) oraz obniżeniem ilości zaadsorbowanego powierzchniowo fibrynogenu. Kontakt modyfikowanych materiałów z krwią pokazał, że wprowadzenie pokrycia modyfikującego skutkowało również obniżeniem odsetka powierzchni zajętej przez płytki krwi, choć należy podkreślić, że wartości te dla niemodyfikowanego PU są również niskie (< 5%), co wynika z wysokiej atrombogenności wybranego przeze mnie polimeru. Pokrycie nie spowodowało zmian w czasie krzepnięcia krwi,

wyrażonym jako APPT (czas częściowej tromboplastyny po aktywacji), co jest wynikiem korzystnym i oczekiwanym.



Rys.7: Etapy procesu chemicznego związania peptydu z powierzchnią PU z wykorzystaniem kwasu akrylowego: (1) redukcja jonów Ce^{4+} prowadząca do wytworzenia wolnych rodników na atomie azotu w grupie uretanowej i przyłączenia cząsteczek kwasu akrylowego, (2) przyłączenie peptydu do wprowadzonych powierzchniowych grup karboksylowych.

Przypomnę, że w przypadku pokryć peptydowych, ich głównym zadaniem było zwiększenie adhezji EC. Wykazałam, że efekt taki występował, jednak nie dla wszystkich warunków prowadzenia procesu modyfikacji. Korzystny wpływ pokrycia na adhezję EC występował w przypadku stosowania 1%, 2% i 3% (obj./obj.) stężenia AA w roztworze modyfikującym. W przypadku zastosowania najwyższego badanego stężenia (5%) pozytywny efekt był widoczny tylko w przypadku późniejszego przyłączenia cząsteczki TRIS. W przypadku przyłączenia peptydu REDV liczba komórek była istotnie mniejsza. Na podstawie tych wyników wnioskowałam, że zbyt duża liczba grup karboksylowych wprowadzona na powierzchnię może powodować miejscowe zakwaszenie i silny ładunek ujemny odpychający komórki. W przypadku przyłączenia do pokrycia cząsteczki TRIS zjawiska tego nie zaobserwowano, prawdopodobnie ze względu na właściwości buforujące TRIS. Możliwe, że mała cząsteczka TRIS (zdecydowanie mniejsza niż peptyd zbudowany z 10 aminokwasów) jest w stanie dyfundować głębiej w wytworzoną warstwę i wejść w reakcję z większością

dostępnych grup karboksylowych, tworząc obojętne amidy. Amidy te mogą stać się dobrymi punktami adhezji komórek. Natomiast wprowadzenie REDV na powierzchnię z poliakrylanem zwiększyło ogólną liczbę grup karboksylowych na powierzchni (co potwierdziły przeprowadzone testy kolorymetryczne), powodując dalsze zakwaszenie powierzchni i wzrost ładunku ujemnego.

4.5. Proces wytwarzania poliuretanowych protez naczyniowych

Po opracowaniu metod chemicznej modyfikacji powierzchni poliuretanu skupiłam się na procesie wytwarzania protez naczyniowych o założonych parametrach. Prace kontynuowałam na poliuretanach ChronoFlex, aby móc w późniejszych etapach badań zastosować opracowane wcześniej metody modyfikacji. Realizacja badań w szerokim zakresie (opracowanie procesu wytwarzania, analiza wybranych właściwości fizycznych, mechanicznych, biologicznych *in vitro* i *in vivo*), a także stworzenie mojego pierwszego zespołu badawczego możliwe było dzięki uzyskaniu przeze mnie grantu „BioGraft – biomimetyczne protezy naczyniowe małych średnic” w ramach konkursu LIDER VIII, NCBiR.

Przyjęłam następujące założenia projektowe dla opracowywanych protez:

1. średnica wewnętrzna protezy z zakresu tzw. małych średnic (< 6 mm);
protezy małych średnic są protezami, które mogą być stosowane w zabiegach pomostowania wieńcowego (CABG) ze względu na zbliżone wielkości średnic –średnia średnica wewnętrzna głównych tętnic wieńcowych wynosi ok. 3,5 mm (41)
2. moduł Younga (MY) zbliżony do wartości dla ludzkich naczyń (< 10 MPa);
zgodność mechaniczna proteza-naczynia jest istotnym czynnikiem wpływającym na ryzyko wykrzepiania krwi wewnątrz zespolenia
3. grubość ściany zapewniająca dobrą elastyczność i pamięć kształtu, przy jednoczesnej szczelności;
grubość ściany protezy wpływa na elastyczność, zdolność do zachowania cylindrycznego kształtu w trakcie zabiegu implantacji i późniejszej pracy (pamięć kształtu), wpływa na zjawisko tzw. „pocenia” protezy – czyli przesiąkania krwi przez ścianę protezy. Jednocześnie zbyt duża grubość negatywnie wpływa na sam zabieg implantacji – występują problemy z szyciem i stworzeniem szczelnego zespolenia
4. odpowiedni rozmiar porów powierzchni wewnętrznej i zewnętrznej;
rozmiar porów może regulować tempo adhezji i proliferacji komórek, w założeniu powierzchnia wewnętrzna powinna wspierać rozwój SMC, a wewnętrzna - EC
5. ściana protezy zbudowana z warstw o różnej morfologii:
warstwa wewnętrzna – morfologia wspierająca adhezję i proliferację EC oraz tworzenie monowarstwy na powierzchni materiału, bez migracji komórek w głąb materiału
warstwa zewnętrzna – morfologia wspierająca proliferację SMC wraz z ich migracją w głąb materiału

Zdecydowałam się na zbadanie możliwości wytwarzania poliuretanowych protez o podanych wyżej parametrach za pomocą rozdmuchu roztworu polimeru (SBS). SBS umożliwia otrzymanie materiałów nano- i mikrowłóknistych o zakresie średnic zbliżonym do zakresów otrzymywanych za pomocą jednej z popularniejszych technik otrzymywania włókien - elektroprzędzenia (ES) (42). Jednak proces SBS ma w porównaniu do ES kilka istotnych zalet, m.in. brak konieczności stosowania wysokiego napięcia (wymagane w procesie ES), które często może prowadzić do przegrzania, degradacji polimeru i zmiany jego właściwości (43). Ponadto, w procesie ES właściwości otrzymanych włókien silnie zależą od właściwości dielektrycznych zastosowanych rozpuszczalników (44). Zjawisko to nie występuje w przypadku SBS, mniejsza jest również liczba zmiennych, które kontrolują proces. Ogromną zaletą SBS w porównaniu do ES jest jego wydajność - SBS umożliwia otrzymanie włókien z około 10-krotnie wyższą wydajnością. Nasze próby wykazały, że w przypadku zastosowania roztworu poliuretanu ChronoFlex 75A wytworzenie włókien o średniej średnicy 900 nm w ciągu 30 minut procesu skutkowało włókniną o grubości około 50 μm dla procesu ES oraz około 500 μm dla procesu SBS. Tak duża różnica w wydajności była dla mnie bardzo istotna – szczególnie, że końcowy produkt (proteza) ma grubość ściany w zakresie 500-1000 μm , jest to więc materiał stosunkowo gruby. Proces SBS, w odróżnieniu do ES, jest procesem łatwo skalowalnym, możliwy jest więc transfer opracowanej technologii na skalę przemysłową.

Pierwsze etapy badań to dobór parametrów procesowych tak, aby uzyskać produkt o założonych właściwościach. SBS daje pod tym względem duże możliwości. Siłą napędową procesu jest ciśnienie gazu roboczego, który wraz z roztworem polimeru podawany jest do dyszy. Pod wpływem ciśnienia na wylocie z dyszy tworzą się włókna polimeru, które następnie osadzają się na obracającym się kolektorze. Właściwości otrzymanego materiału zależą od układu polimer-rozpuszczalnik, w szczególności lepkości i stężenia roztworu polimeru oraz lotności rozpuszczalnika (45). Na właściwości materiału wpływają również: prędkość przepływu roztworu polimeru, ciśnienie gazu roboczego, odległość dysza-kolektor oraz prędkość obrotowa kolektora. Zmiana tych parametrów umożliwia otrzymanie materiałów różniących się grubością, porowatością, czy średnicą i ukierunkowaniem włókien (46) (47). Badania wstępne (zrealizowane przez moją Dyplomantkę: I. Łopianiak, praca magisterska „*Opracowanie struktur nano- i mikrowłóknistych do trójwymiarowej hodowli komórkowej*”, 2019) obejmowały m.in. dobór ciśnienia sprężonego powietrza (w zakresie 0,05-0,2 MPa) oraz natężenia przepływu roztworu polimeru (w zakresie 10-50 ml/h) tak, aby uzyskać włókna o powtarzalnej morfologii oraz minimalnej ilości „koralików” (tzw. *bead-on-string fibers*). Badania te wykazały, że najkorzystniejsze warunki to ciśnienie gazu roboczego 0,1MPa przy natężeniu przepływu roztworu polimeru 30 ml/h. Takie wartości stosowano we wszystkich późniejszych pracach (H6-H9).

W pierwszych etapach prac badałam włókniny wytworzone z poliuretanów o różnej twardości: ChronoFlex 75A (miękki) oraz 75D (twardy) oraz porównywałam ich własności.

Badania wykazały lepszy wzrost komórek na materiałach twardszych (75D, wyniki nie opublikowane). Jednak materiały te charakteryzowały się dużo gorszymi wartościami mechanicznymi (mała pamięć kształtu), i wyższymi wartościami MY. Podjęłam próby wytwarzania protez mieszanych, wytworzonych z polimeru twardego (warstwy zewnętrzne, kontaktujące się z tkankami) oraz miękkiego (warstwa środkowa), ale próby takie zakończyły się niepowodzeniem (delaminacja warstw w próbach zmęczeniowych). Ostatecznie podjęłam decyzję o kontynuowaniu badań na polimerze 75A (miękki). W tym miejscu warto wspomnieć, że praca **H6** prezentuje wyniki otrzymane dla poliuretanów 75D, dlatego też wartości MY prezentowane w pracy są stosunkowo wysokie. Prace **H7**, **H8** oraz **H9** prezentują włókniny otrzymane z poliuretanu 75A (wartości MY są niższe).

Publikacje **H6-H9** prezentują kolejne etapy badań nad opracowaniem procesu otrzymania włóknistych protez naczyniowych. Praca **H6** przedstawia wpływ wybranych technik sterylizacji na właściwości opracowanych włókien poliuretanowych. W pracy **H7** skupiłam się na poszukiwaniu zależności między morfologią powierzchni włóknistej a wzrostem komórek EC i SMC. W pracy **H8** prezentuję wpływ modyfikacji chemicznej (opisanej w H3 i H4) na wybrane właściwości włókien. Praca **H9** prezentuje opracowane warstwowe protezy naczyniowe i ich podstawowe właściwości oraz bada możliwości zasiedlania protez komórkami za pomocą techniki MTE (zasiedlanie magnetyczne, ang. *magnetic tissue engineering*). W pracach **H7-H8** skupiam się na charakteryzacji powierzchni i analizie procesów przebiegających na powierzchni materiału. Materiał cylindryczny badany w tych pracach nie jest końcową wersją warstwowej protezy. Dopiero praca **H9** prezentuje finalny produkt, którego strukturę dobrałam na podstawie wyników uzyskanych w poprzednich etapach badań.

Jednym z pierwszych zagadnień nad którymi pochyliłam się rozpoczynając prace z włókninami poliuretanowymi były badania wpływu procesów sterylizacji na właściwości materiału. Sterylizacja implantu jest etapem koniecznym, choć często nie pozostaje bez wpływu na właściwości materiału (48). W szczególności sterylizacja włókien może być wyzwaniem - jest to materiał stosunkowo delikatny, mogący łatwo ulec deformacjom, a ze względu na jego wysoką porowatość powierzchniowe metody sterylizacji mogą być nieefektywne. Początkowo w badaniach stosowałam jedną z prostszych i popularniejszych technik – immersję w 70% etanolu. Zauważyłam negatywny wpływ tej techniki na właściwości mechaniczne materiału. Postanowiłam poszukać alternatywnych metod oraz zbadać ich wpływ na właściwości włókien (praca **H6**). Zdecydowałam się na analizę metod sterylizacji/dezynfekcji najczęściej stosowanych w pracy z biomateriałami: promieniowanie gamma, elektronowe, UV oraz kąpiel w 70% etanolu. Jako alternatywną metodę zaproponowałam kąpiel antybiotykową (AMS – ang. *antimicrobial solution*). Metoda ta jest stosunkowo nowa i mniej popularna od metod radiacyjnych, ale wykazano jej skuteczność np. dla nanowłókien PLGA (49). Efektywność zaproponowanych procesów sterylizacji/dezynfekcji została zbadana za pomocą dwóch metod

– poprzez kontakt materiału z płynnym medium hodowlanym oraz agarem. Pierwsza metoda weryfikacji efektów sterylizacji okazała się mało czuła – nie wykryto oznak zakażenia dla żadnej z metod sterylizacji, również dla kontroli pozytywnej (materiał niesterylny). Zdecydowanie czulszą metodą był kontakt z agarem – badania to pokazało, że materiały sterylizowane technikami radiacyjnymi oraz etanolem nie były w pełni sterylne – w części lub wszystkich próbkach analizowanych w danej grupie dochodziło do zakażenia w ciągu 7 dni inkubacji z agarem. Dodatkowo, promieniowanie gamma powodowało widoczne makroskopowo zmiany materiału (zmiana koloru). Z kolei w przypadku materiałów po kąpieli AMS nie doszło do zakażenia, próbki nie zmieniły obrazu makroskopowego.

Żywość komórek hodowanych na materiałach przekraczała 70% dla wszystkich testowanych metod sterylizacji/dezynfekcji, co oznacza, że materiał zachowywał swoją biogodność. Żadna technika nie spowodowała widocznych zmian w obrazie mikroskopowym oraz średniej średnicy włókien. Jednak, w przypadku większości stosowanych technik doszło do istotnych zmian właściwości mechanicznych. Promieniowanie elektronowe oraz kąpiele etanolowa i AMS skutkowały istotnym zwiększeniem MY włókien z wartości około 5 MPa (materiał przed sterylizacją) do wartości około 10 MPa. Badania pokazały, że żadna z analizowanych technik nie jest techniką idealną, pozostającą bez wpływu na właściwości włókien przy jednoczesnej wysokiej efektywności. Jednak, biorąc pod uwagę wszystkie otrzymane wyniki oraz łatwość przeprowadzania procesu wnioskowałam, że kąpiel AMS może być skuteczną techniką dezynfekcji protez wykorzystywaną w trakcie badań *in vitro* oraz *in vivo*. Potwierdzeniem tych wniosków są późniejsze badania *in vivo* przeprowadzone w projekcie BioGraft (badanie nie opublikowane). Badane protezy przygotowywano do implantacji poprzez inkubację w AMS, nie stosowano innych technik sterylizacji/dezynfekcji. Badania histopatologiczne tkanek sąsiadujących z implantem nie wykazywały oznak zakażenia (brak bakterii Gram+, brak odczynu zapalnego). Wyniki te planuję opublikować po zakończeniu całego cyklu zabiegów implantacji.

Po dokonaniu wyboru odpowiedniej twardości PU oraz techniki sterylizacji postawiłam sobie za cel określenie wpływu morfologii powierzchni na adhezję i wzrost komórek (**praca H9**). Skupiłam się na komórkach budujących ściany naczynia krwionośnego i pełniących kluczowe funkcje w ich funkcjonowaniu: EC oraz SMC.

Wiele badań pokazuje, że wzrost komórek jest silnie zależny od chropowatości powierzchni, a w przypadku materiałów włóknistych od średniej średnicy włókien. Charakter tej relacji zależy od rodzaju komórek (50). Analiza literatury pokazuje, że nie ma prostej i jednoznacznej odpowiedzi na pytanie jaka powierzchnia jest korzystniejsza. W przypadku EC większość badań sugeruje lepszą adhezję do nanowłókien w porównaniu do mikrowłókien (51). Istnieją jednak badania wskazujące na przeciwną zależność (52). Faktem jest, że w przypadku zasiedlania powierzchni protez naczyniowych EC głównym celem jest stworzenie monowarstwy na powierzchni protezy bez nadmiernej migracji komórek w głąb materiału. Z

drugiej strony, w przypadku wzrostu SMC istotna jest możliwość migracji komórek w głąb struktury, wydzielanie macierzy zewnątrzkomórkowej (m.in. kolagenu) i odbudowa struktury ściany naczyń. W tym przypadku korzystniejsze mogą okazać się włókna większe, które gwarantują obecność we włókninie porów o większych rozmiarach.

Biorąc pod uwagę powyższe, postanowiłam wytworzyć i poddać analizom 6 typów powierzchni, różniących się morfologią. Zaplanowałam otrzymanie materiałów o średniej średnicy włókien wynoszącej w przybliżeniu 200, 500 oraz 900 nm. Istnieją badania, które sugerują lepszy wzrost EC na powierzchniach stałych niż na powierzchniach włóknistych (53). Z tego względu, oprócz klasycznych materiałów włóknistych (grupa materiałów oznaczona „1L”) postanowiłam włączyć do badań materiały o morfologii mieszanej, lito-włóknistej (grupa materiałów oznaczona „2L”). W grupie 2L również wytworzono materiały, dla których zakładane średnie średnice włókien wynosiły 200, 500 oraz 900 nm.

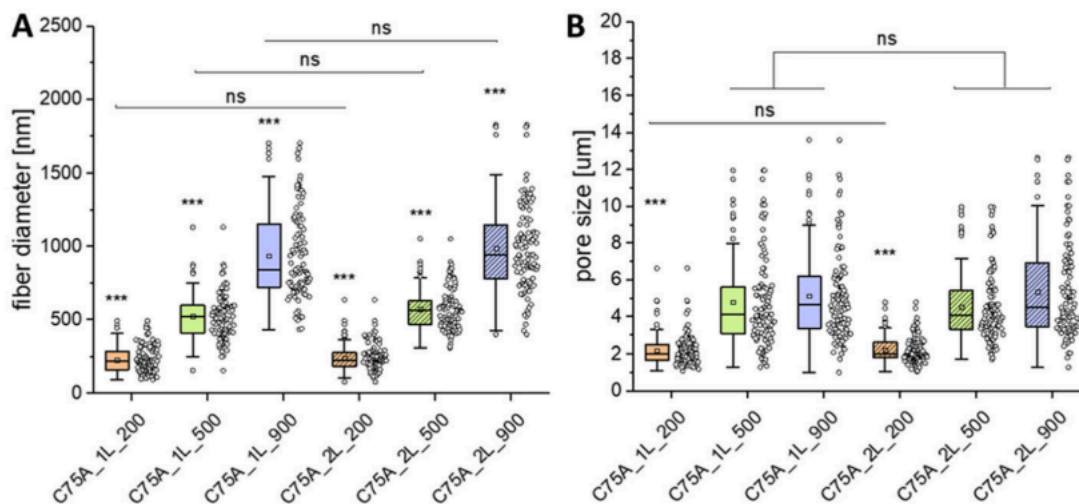
Otrzymanie materiałów o założonej morfologii umożliwiło stosowanie w procesie SBS roztworów polimeru o różnym stężeniu (co skutkowało uzyskaniem włókien o różnej średnicy) oraz stosowanie zmiennej odległości roboczej kolektor-dysza (co skutkowało wytworzeniem materiałów włóknistych lub lito-włóknistych). Zestawienie typów powierzchni oraz wartości stężenia roztworu polimeru i odległości roboczej stosowanej w procesie przedstawiono w Tab.1.

Tab.1: Warianty materiałów badane w pracy **H9**.

typ powierzchni	stęż. roztworu polimeru [% mas./mas.]	odl. robocza dla w-wy wewn. [cm]	morfologia powierzchni wewnętrznej	odl. robocza dla w-wy zewn. [cm]	morfologia powierzchni zewnętrznej
C75A_1L_200	2	30	włókna 200 nm	30	włókna 200 nm
C75A_1L_500	4	30	włókna 500 nm	30	włókna 500 nm
C75A_1L_900	5	30	włókna 900 nm	30	włókna 900 nm
C75A_2L_200	2	10	film/ włókna 200 nm	30	włókna 200 nm
C75A_2L_500	4	10	film/ włókna 500 nm	30	włókna 500 nm
C75A_2L_900	5	10	film/ włókna 900 nm	30	włókna 900 nm

Zestawienie wyników pomiarów dla wszystkich 6 typów analizowanych materiałów przedstawia Rys.8. W przypadku materiałów typu 2L parametry te wyznaczono dla obszarów włóknistych. Zastosowane parametry procesowe pozwoliły uzyskać włókniny o średnich średnicach włókien zbliżonych do założonych, czyli 200, 500 oraz 900 nm. Zwiększenie stężenia roztworu polimeru prowadziło do otrzymania włókien o większych średnicach i szerszych rozkładach średnic. W przypadku włókien o najmniejszych średnicach

(200 nm) otrzymano najmniejsze rozmiary porów (średnia wielkość w przybliżeniu 2 μm) oraz wąski rozkład wielkości. Największe zaobserwowane pory nie przekraczały wielkością 10 μm . Dla włókien 500 i 900 nm otrzymano podobne wielkości średnich rozmiarów porów (w przybliżeniu 5 μm) oraz podobny rozkład wielkości. W porównaniu do włókien 200 nm był to szerszy rozkład wielkości, a największe zmierzone pory przekraczały wielkością 10 μm .



Rys.8: Rozkład wartości średnic włókien i wielkości porów dla materiałów analizowanych w pracy H9.

Dla powyższych materiałów przeanalizowałam wzrost EC na ich powierzchni. Wykazałam, że w początkowej fazie hodowli adhezja komórek było porównywalna na wszystkich typach analizowanych morfologii (zbliżone wartości liczby komórek/ mm^2 w pierwszym dniu hodowli). Wraz z czasem trwania hodowli zaobserwowałam wyższe odsetki powierzchni skolonizowanej komórkami dla materiałów o morfologii mieszanej, włóknisto-litej. Z kolei porównując materiały różniące się średnicą włókna, wyższe wartości powierzchni pokrytej komórkami zanotowałam dla materiałów o średnicach mniejszych.

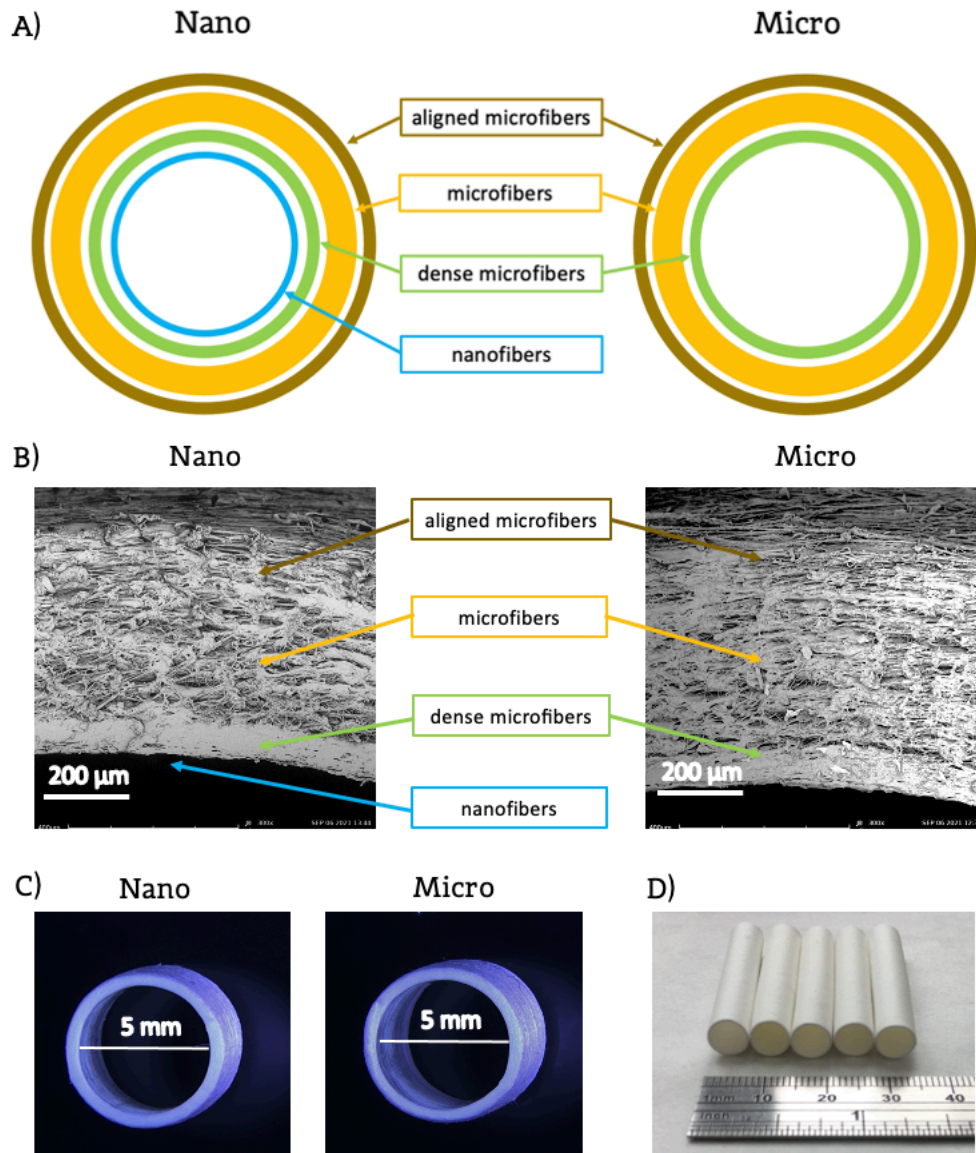
W przypadku analizy wzrostu SMC zbadałam trzy typy powierzchni różniące się średnicą włókna: 200, 500 i oraz 900 nm. Ze względu na założenia dotyczące migracji komórek SMC wewnątrz materiału zrezygnowałam z analizy struktur mieszanych, lito-włóknistych. Wykazałam, że zarówno liczba komórek jak i odsetek powierzchni pokrytej przez komórki były najwyższe dla materiału o największej badanej średnicy włókien (900 nm). Analiza mikroskopowa pozwala zauważyć też istotną różnicę w morfologii SMC rosnących na włóknach 200 nm i 900 nm. Na włóknach 200 nm komórki przyjmowały morfologię silnie rozplaszczoną, z kolei na materiale włóknach 900 nm komórki przez cały analizowany czas hodowli utrzymywały strukturę bardziej sferyczną. Analizując migrację komórek w głąb materiału wykazałam, że zarówno na początku hodowli (1dzień), jak i na końcu (7 dni) głębokość migracji była znacząco wyższa na materiale 900 nm. Uzyskane wyniki pozwoliły

mi na wyselekcjonowanie włókien 900 nanometrów jako najkorzystniejszych do stworzenia zewnętrznej warstwy protezy.

Praca **H9** prezentuje właściwości protezy warstwowej złożonej z trzech (proteza Micro) lub czterech (proteza Nano) warstw włóknistych różniących się morfologią (Rys.9). Biorąc pod uwagę wyniki otrzymane na w **H8** przyjął, że warstwa zewnętrzna powinna być zbudowana z włókien 900 nm. Zaplanowałam również dodanie cienkiej warstwy włókien 900 nm o ułożeniu ukierunkowanym – badania przeprowadzone przez nasz Zespół (manuskrypt w przygotowaniu) wykazały, że ukierunkowanie włókien 900 nm wspiera adhezję SMC. Ukierunkowanie włókien uzyskano dzięki zwiększeniu prędkości obrotowej kolektora. Od strony wewnętrznej zaproponowałam warstwę gęsto upakowanych włókien o grubości z zakresu 80-100 μm , która doszczelnia protezę i ogranicza zjawisko przeciekania krwi przez ściany. Był to problem, który pojawiał się przy przepływie krwi przez protezy w układach przepływowych. Dodanie warstwy gęsto upakowanych włókien o podanej grubości wyeliminowało ten problem. Dodatkowo zaproponowałam dodanie cienkiej warstwy nanowłókien od luminalnej powierzchni protezy (typ Nano). Typ Micro posiada identyczny układ warstw, ale pozbawiony jest wewnętrznej warstwy nanowłókien. Celem badań było porównanie właściwości obu typów protez, a w szczególności przeprowadzenie pierwszych prób zasiedlania protezy EC.

W badaniach nad wytwarzaniem protez metodą SBS moim celem nadrzędnym było badanie właściwości produktu, nie zaś analiza samego procesu. Dlatego też, zdecydowałam się nie wykonywać dodatkowych eksperymentów dotyczących np. optymalizacji procesu z wykorzystaniem metod planowania eksperymentu. Manipulacja wspomnianymi parametrami procesowymi umożliwiła uzyskania protez o założonych właściwościach fizycznych i mechanicznych.

Jednym z ważniejszych założeń, które udało się zrealizować była odpowiednia wytrzymałość mechaniczna i elastyczność protezy. Literatura podaje następujące wartości MY dla naczyń krwionośnych: 23,7 MPa dla SV, 16,8 dla IMA oraz 1,4 MPa dla naczyń wieńcowych (54). Biorąc pod uwagę potencjalne zastosowanie opracowywanych protez w zabiegach CABG założyłam, że docelowe wartości MY powinny mieścić się w zakresie 1-10 MPa. Założenie to udało się spełnić - MY wytworzonych protez wynosił 2,5 MPa dla protez Nano oraz 2,4 MPa dla protez Micro. Uzyskanie zbliżonych wartości MY dla oby typów protez było wynikiem zamierzonym i oczekiwanym – jak już wspomniano protezy Nano różniły się od protez Micro obecnością cienkiej ($<50 \mu\text{m}$) warstwy nanowłókien, która przy całkowitej grubości ściany wynoszącej prawie 700 μm nie zmieniała w sposób istotny właściwości mechanicznych całej protezy. Na właściwości mechaniczne wpływają więc głównie właściwości warstwy środkowej oraz zewnętrznej.



Rys.9: Prezentacja opracowanych protez warstwowych typu Nano i Micro: schemat ideowy poszczególnych warstw budujących ścianę (A), widok mikroskopowy przekroju ściany wytworzonych protez (B), widoki makroskopowe (C i D).

Endotelializacja protez naczyniowych *in vitro* zakłada kolonizację protezy komórkami pacjenta przed zabiegiem implantacji. W tym celu konieczne jest opracowanie systemu efektywnego zasiedlenia luminalnej (wewnętrznej) powierzchni protezy komórkami. Prowadzenie takich hodowli okazało się dużym wyzwaniem. W ramach pracy magisterskiej mojej Dyplomantki (A. Wojciechowska, „Wzrost i aktywność komórek hodowanych na powierzchni protez naczyniowych w warunkach dynamicznych”, 2021) zbadałyśmy kilka technik zasiedlania protez komórkami śródbłonna. Wyniki nie były zadowalające – adhezja komórek była niska i nierównomierna na całej powierzchni wewnętrznej protezy. Dużą szansą na rozwiązanie tego problemu okazał się mój wyjazd stażowy do kliniki uniwersyteckiej w Erlangen. Zespół pracuje m.in. nad wykorzystaniem pola magnetycznego

i ferromagnetycznych nanocząstek w hodowlach komórkowych. Zasiedlanie magnetyczne (MTE ang. *magnetic tissue engineering*) jest ciekawą techniką umożliwiającą kolonizację komórkami materiałów o zróżnicowanej geometrii, np. mocno porowatych lub cylindrycznych. Idea polega na wprowadzenie magnetycznych nanocząstek (SPIONs, ang. *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*) do wnętrza komórek, a następnie umieszczenia tak przygotowanej zawiesiny wraz z biomateriałem w polu magnetycznym. Pole magnetyczne „kieruje” komórkami, wymuszając ich migrację w określonym kierunku i osadzanie na materiale.

W trakcie mojego pobytu stażowego podjęłam udaną próbę wykorzystania tej techniki i unikalnego sprzętu dostępnego w jednostce goszczącej przeprowadzając hodowle EC na protezach typu Nano oraz Micro (model hodowli 3D). Jednocześnie przeprowadziłam klasyczną hodowlę na obu typach powierzchni (model hodowli 2D). Oczywiście hodowla prowadzona na płaskich materiałach włóknistych jest również hodowlą, w której komórki rosną w trzech wymiarach, niemniej, w celu rozróżnienia dwóch stosowanych w moich badaniach modeli, zdecydowałam się na zastosowanie takiej nomenklatury. Wykazałam, że różnica w odsetku powierzchni pokrytej komórkami po pierwszym i trzecim dniu hodowli pomiędzy materiałami Nano i Micro była niewielka ($p > 0,005$). Po 7 dniach hodowli w przypadku hodowli 2D zauważono istotne różnice – wyższy odsetek powierzchni uzyskano na powierzchniach typu Nano. W przypadku hodowli 3d różnica ta była nieistotna statystycznie. Porównanie wyników uzyskanych z hodowli EC w modelu 2D i 3D doprowadziło mnie do ciekawych wniosków - włókna o mniejszych rozmiarach (Nano) wspomagają proliferację EC, jest to jednak efekt widoczny tylko w hodowli na płaskich materiałach (model 2D). Nie jest to efekt na tyle silny, aby zadziałał w bardziej wymagającym środowisku – na pewno za takie można uznać hodowlę na strukturze cylindrycznej (model 3D), gdzie siła grawitacyjna nie wspomaga procesu adhezji (tak, jak ma to miejsce w hodowli 2D). Jest to ważny wniosek, zwłaszcza biorąc pod uwagę fakt, że zdecydowana większość badań analizujących wpływ struktury powierzchni na wzrost komórek prezentowanych w literaturze dotyczy klasycznych hodowli 2D, prowadzonych na materiałach płaskich.

Wykazałam również, że tempo proliferacji komórek (wyrażone jako zmiana odsetka powierzchni zajętej przez komórki) jest istotnie różne dla hodowli w modelu 2D i 3D. Wartość ta uległa zmianie od około 20% po pierwszym dniu hodowli do około 70% po 7 dniach hodowli (protezy Nano) w hodowli 2D. Natomiast w hodowli 3D średni odsetek powierzchni zajętej przez komórki na protezach utrzymywał się poniżej 20%. Widać to wyraźnie na obrazach mikroskopowych – na materiałach płaskich widoczne jest powiększanie się obszarów skolonizowanych przez komórki. W przypadku protez odsetek powierzchni zajętej przez komórki utrzymuje się na zbliżonym poziomie w 1,3 i 7 dniach hodowli. Ta różnica wyraźnie pokazuje jak istotna jest weryfikacja wyników hodowli 2D na strukturach docelowych, w omawianym przypadku – cylindrycznych. Oczywiście prowadzenie hodowli na prostszych modelach ma również swoje mocne strony i jest w pełni uzasadnione – zwłaszcza w

początkowych etapach opracowywania nowych materiałów, kiedy zakłada się zbadanie dużej ilości wariantów materiałowych i wytypowanie tych najbardziej obiecujących. Taką taktykę obrałam również w swoich badaniach.

Uzyskane wyniki hodowli komórkowej EC na powierzchniach protez poliuretanowych niemodyfikowanych potwierdzają moje pierwotne założenia – poliuretan, pomimo stosunkowo dobrych jak na polimer syntetyczny właściwości adhezyjnych względem komórek wymaga przeprowadzenia modyfikacji chemicznych, które pozwoliłyby na uzyskanie wyższego odsetka powierzchni skolonizowanej przez komórki. Jednocześnie zaproponowana metoda zasiedlania protez jest metodą skuteczną, możliwą do stosowania w dalszych badaniach nad protezami włóknistymi.

4.6. Zastosowanie wybranych metod modyfikacji do modyfikacji wewnętrznej powierzchni protez

Opracowane technologie modyfikacji poliuretanów (zaprezentowane w pierwszej części autoreferatu) wykorzystałam w późniejszych etapach moich badań do modyfikacji wewnętrznej powierzchni nowoopracowanych poliuretanowych protez naczyniowych. Praca **H9** prezentuje wyniki modyfikacji protezy włóknistej pokryciem z poliakrylanów. Praca **H10** prezentuje protezy naczyniowe pokryte powłoką hydrożelową. Sposób otrzymywania włóknistych protez naczyniowych modyfikowanych pokryciem bioaktywnym w układzie przepływowym (silanicacja lub poliakrylany) jest częścią patentu **H11**. Powyższe prace łączą dwa główne obszary badawcze, którymi zajmowałam w ciągu ostatnich lat – badania nad chemiczną modyfikacją poliuretanów i wytwarzaniem powłok hemozgodnych oraz badania nad metodami otrzymywania poliuretanowych protez naczyniowych.

W pracy **H9** przeprowadziłam analizę wpływu prezentowanego wcześniej pokrycia peptydowego poliakrylanów na właściwości włóknin. Wyniki wcześniej prowadzonych prac nad powłokami z poliakrylanów (praca **H3**) wykazały, że warunki procesowe tj. czas reakcji, temperatura, stężenie reagentów wpływają na właściwości pokrycia, w szczególności gęstość powierzchniową wprowadzonych grup karboksylowych. Moim celem było zbadanie jak proces modyfikacji wpłynie na właściwości fizyczne (średnia średnica, rozmiar porów) i mechaniczne (MY) włókniny oraz dobranie najkorzystniejszych parametrów procesu modyfikacji. Analizowałam również możliwość intensyfikacji pierwszego etapu procesu modyfikacji nanowłókien (polimeryzacja kwasu akrylowego) poprzez zmianę czasu reakcji, temperatury reakcji oraz stężenie inicjatora.

Zdecydowałam, że badaniom tym poddam włókna 200 nm. Założyłam, że włókna te mogą być bardziej wrażliwe na warunki prowadzenia reakcji niż włókna o większych średnicach. Wykazałam, że wszystkie trzy badane zmienne miały wpływ na morfologię włóknin. Średnia średnica włókien rosła wraz z wydłużeniem czasu reakcji. Podobną zależność wykazałam dla temperatury prowadzenia reakcji. Zwiększenie stężenia inicjatora reakcji z

0,01% do 0,05% mas./obj. skutkowało zmianą morfologii włókniny – dochodziło do złączenia struktury pojedynczych włókien na skutek intensyfikacji procesu polimeryzacji kwasu akrylowego. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowałam najkorzystniejsze warunki prowadzenia pierwszego etapu procesu modyfikacji: czas 0,5h, temperatura 25°C, stężenie inicjatora 0,01% mas./obj.

Dla podanych warunków przeprowadziłam proces modyfikacji wewnętrznej powierzchni protez umieszczonych w układzie przepływowym. W tym etapie badań przeprowadziłam pełny, dwuetapowy proces modyfikacji: polimeryzację kwasu akrylowego oraz chemiczne wiązanie peptydu. Następnie dokonałam charakterystyki zmodyfikowanej powierzchni porównując wyniki otrzymane z końca wlotowego i wylotowego protezy. Wykazałam, że proces modyfikacji zaszedł równomiernie na obu końcach protezy modyfikacji – porównanie obu analizowanych obszarów nie wykazało istotnych różnic w badanych wielkościach. Na podstawie obrazów mikroskopowych przekroju ściany zmodyfikowanej protezy można przypuszczać, że dyfuzja reagentów wewnątrz struktury włóknistej zachodzi na głębokość ok 50 µm przy całkowitej grubości włókniny wynoszącej ok. 150 µm i dla takiej warstwy granicznej materiału zachodzi proces modyfikacji (w obrazie mikroskopowym widoczna zmiana porowatości włókniny od strony wewnętrznej, kontaktującej się z roztworem modyfikującym).

Wykazałam, że proces przeprowadzony bez dodatku inicjatora (skutkujący fizycznym osadzeniem kwasu akrylowego na powierzchni włókien) powoduje zmianę zwilżalności z 134° (niemodyfikowana włóknina) do 103°. Przeprowadzenie procesu w takich samych warunkach, ale z dodatkiem inicjatora skutkuje wzrostem zwilżalności do wartości 80°. Chemiczne wiązanie peptydu (potwierdzone analizą spektroskopową powierzchni) powoduje dalszą hydrofilizację powierzchni (50°). Przeprowadzona modyfikacja skutkowałą zwiększeniem MY protezy z 1,8 MPa do 4,0 MPa, jednak nadal była to wartość mieszcząca się z moich założeniach projektowych (MY <10 MPa).

Praca **H10** prezentuje możliwość wykorzystania opracowanej przeze mnie technologii pokrycia hydrożelowego do modyfikacji wewnętrznej powierzchni protez naczyniowych. Wytworzonych metodą inwersji faz (dokładniejszy opis metody w rozdziale “**Prace uzupełniające cykl**”). Analiza mikroskopowa wykazała obecność pokrycia hydrożelowego na całej modyfikowanej powierzchni protezy. Powłoka po wysuszeniu charakteryzowała się niską stabilnością mechaniczną (pęknięcia widoczne na zdjęciach), niemniej było to spowodowano wybraną metodą suszenia (temperatura otoczenia). We wcześniejszych badaniach, przy analizie suchej formy pokrycia stosowano liofilizację. Jest to preferowana metoda suszenia w przypadku hydrożeli – zapewnia wierniejsze odzwierciedlenie porowatej struktury, a otrzymany kserożel jest stabilniejszy mechanicznie.

W porównaniu do prac prowadzonych w **H2** osiągnięto porównywalne wartości HG (z zakresu 15-35 g/m²). Można więc stwierdzić, że twardość stosowanego poliuretanu (**H2**:

ChronoFlex 75D, **H10**: ChronoFlex 45D) oraz sposób jego przetwarzania (**H2**: folia, **H10**: porowata membrana uzyskana metodą inwersji faz) nie ma istotnego wpływu na masę przyłączonego PVP i wytworzonej powłoki. Przedstawiona wartość grubości pokrycia mierzona była w stanie suchym, dlatego są to wartości o wiele niższe niż wartości zmierzone w **H2** (mierzone dla stanu uwodnionego).

Podobnie jak w przypadku poprzednich badań nad powłokami hydrożelowymi, wykazano spadek ilości zaadsorbowanego fibrynogenu o około połowę w porównaniu do powierzchni protez niemodyfikowanych oraz zmniejszenie liczby płytek krwi zaadherowanych do powierzchni. Modyfikacja spełniła więc swoje “pasywne” zadanie – w porównaniu do powierzchni niemodyfikowanej (PU) obniżyła ilość zaadsorbowanych/zaadherowanych komponentów krwi, które biorą udział w procesach krzepnięcia.

Jak już wspominałam, obie opracowane technologie wytwarzania pokryć peptydowych wykorzystywałam w swoich badaniach do modyfikacji wewnętrznej powierzchni opracowanych protez włóknistych. Opis przykładów takiej procedury wraz z propozycją korzystanych warunków procesowych jest częścią patentu T.Ciach, B. Butruk– Raszeja, A. Kuźmińska, M. Wojasiński, *“Sposób wytwarzania protez naczyniowych małych średnic”* (**H11**). Zaproponowałam sposób modyfikacji protez z wykorzystaniem układu przepływowego, w którym kolejne roztwory modyfikujące przepływają przez wnętrze protezy umieszczonej w układzie (sposób opisany również w H9).

4.7. Podsumowanie i najważniejsze osiągnięcia

W prezentowanym w niniejszym autoreferacie cyklu prac zaproponowałam trzy metody modyfikacji chemicznej poliuretanów, których celem była poprawa hemozgodności modyfikowanego polimeru i które mogą być wykorzystane do modyfikacji wewnętrznej powierzchni protez naczyniowych. Metody te różnią się strategią działania przeciwzakrzepowego i oczekiwanym efektem biologicznym.

Pokrycia hydrożelowe prezentują strategię pokryć biopasywnych, które mają na celu zmniejszenie aktywacji procesów krzepnięcia krwi poprzez minimalizację procesów aktywacji, agregacji i adhezji płytek krwi. Wykazałam poprawę hemozgodności modyfikowanego poliuretanu w kontakcie z krwią w warunkach dynamicznych, wyrażoną m.in. jako wzrost odsetka wolnych płytek krwi oraz spadek odsetka wytworzonych agregatów płytkowych.

Pokrycia peptydowe prezentują strategię pokryć bioaktywnych, które mają na celu poprawę adhezji komórek śródbłonna do powierzchni modyfikowanej. W odróżnieniu do licznych doniesień literaturowych często proponujących w takich rozwiązaniach molekuly nieselektywne (np. RGD – zwiększający adhezję zarówno komórek śródbłonna jak i płytek krwi) zdecydowałam się na zastosowanie peptydu, który nie wykazuje działania promującego adhezję płytek krwi. Zaproponowałam dwie metody chemicznego wiązania peptydu. W przypadku obu proponowanych rozwiązań doszło do zwiększenia adhezji komórek śródbłonna,

(dla wybranych warunków prowadzenia procesu modyfikacji), przy jednoczesnym braku zwiększenia (lub zmniejszeniu) adhezji płytek krwi. Metoda z użyciem kwasu akrylowego jest metodą korzystniejszą ze względu na mniejszą liczbę etapów koniecznych do przeprowadzenia modyfikacji.

Drugi obszar badawczy dotyczy metod wytwarzania cylindrycznych szkieletów protez naczyniowych, które następnie mogą być modyfikowane opracowanymi pokryciami. Zaproponowałam sposób wytwarzania poliuretanowych protez włóknistych za pomocą rozdmuchu roztworu polimeru. Metoda stanowi alternatywę dla procesu elektroprzędzenia, najczęściej wykorzystywanego do produkcji materiałów włóknistych, charakteryzującego się dużo niższą wydajnością, większą ilością zmiennych procesowych i trudnością w skalowaniu procesu (m.in. ze względu na konieczność stosowania pola elektrycznego). Zaproponowałam protezy warstwowe, zbudowane z kilku warstw włóknistych różniących się morfologią, tak, aby spełnić postawione założenia dotyczące m.in. właściwości mechanicznych, szczelności oraz rozmiaru porów/włókien wspierających rozwój odpowiednich typów komórek. Zgodnie z moją wiedzą do tej pory nie prezentowano w literaturze metody produkcji protez poliuretanowych z wykorzystaniem rozdmuchu roztworu polimeru. Pierwsze zabiegi implantacji *in vivo* na modelu zwierzęcym (tętnica udowa, owce) protez modyfikowanych pokryciem peptydowym (metoda bazująca na szczepieniu AA) zostały już przeprowadzone (badania w ramach projektu BioGraft, wyniki jeszcze nie opublikowane). Prace są kontynuowane w ramach kolejnego projektu (OPUS-LAP, NCN), przy współpracy z zespołem niemieckim z Kliniki w Erlangen oraz chirurgami naczyniowymi ze Szpitala Bielańskiego w Warszawie, implantacje są w toku.

Wszystkie metody prezentowane w pracy (modyfikacja powierzchni, wytwarzanie struktur włóknistych) zostały opracowane z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych, certyfikowanych poliuretanów, które są już stosowane do produkcji implantów kontaktujących się z krwią (protezy serca) i w tych zastosowaniach dają bardzo dobre rezultaty. Wszystkie procesy modyfikacji powierzchni są to metody nowe, które nie były wcześniej prezentowane w literaturze. Zarówno metody modyfikacji jak i metoda wytwarzania protez włóknistych są przedmiotem ochrony patentowej („*Sposób otrzymywania wyrobów polimerowych pokrytych warstwą innego polimeru*” – metoda wytwarzania powłok hydrożelowych, „*Sposób wytwarzania protez naczyniowych małych średnic*” – metoda wytwarzania protez włóknistych modyfikowanych pokryciem peptydowym).

Za swoje **najważniejsze osiągnięcia** i wkład w rozwój dyscypliny uważam:

- opracowanie metod chemicznej modyfikacji powierzchni poliuretanów:
 - o chemiczne wiązanie peptydu poprzez silanizację powierzchni
 - o chemiczne wiązanie peptydu poprzez szczepienie kwasu akrylowego katalizowane jonami ceru
 - o wytworzenie warstwy hydrożelowej poprzez zmodyfikowaną reakcję Fentona

- opracowanie metod umożliwiających analizę wybranych właściwości (w szczególności biologicznych) otrzymywanych powierzchni
- dla każdego z zaproponowanych pokryć modyfikujących wykazanie pozytywnego i oczekiwanego efektu biologicznego
- zbadanie wpływu wybranych parametrów procesowych procesu SBS na właściwości warstwowych włóknistych protez naczyniowych
- określenie wpływu wybranych metod sterylizacji/dezynfekcji na właściwości materiału włóknistego oraz zaproponowanie metody najkorzystniejszej
- otrzymanie warstwowych protez włóknistych o założonych właściwościach fizycznych i mechanicznych
- zbadanie wpływu morfologii włókien poliuretanowych na wzrost komórek śródbłonka oraz wskazanie morfologii najkorzystniejszej
- zbadanie wpływu modyfikacji chemicznej kwasem akrylowym na właściwości nanowłókien PU oraz wskazanie warunków najkorzystniejszych
- potwierdzenie możliwości zastosowania techniki zasiedlania magnetycznego w procesie kolonizacji opracowanych protez poliuretanowych komórkami śródbłonka.

4.8. Prace uzupełniające cykl

Prace stanowiące cykl habilitacyjny prezentują w mojej ocenie najważniejsze osiągnięcia, które udało mi się uzyskać podczas badań z zakresu powierzchni hemozgodnych i protez naczyniowych. Oprócz wymienionych prac jestem współautorem publikacji, które są bezpośrednio związane z prezentowanymi badaniami i uzupełniają tematykę.

Uzupełnienie badań dotyczących materiałów włóknistych otrzymywanych techniką SBS stanowi praca **A22**, która prezentuje badania wstępne – dobór podstawowych parametrów procesowych procesu SBS (m.in. ciśnienie powietrza, natężenie przepływu roztworu polimeru) oraz wpływ stężenia roztworu polimeru na średnią średnicę otrzymanych włókien.

W ramach realizacji projektu BioGraft wraz z Zespołem opracowaliśmy drugą technologię wytwarzania protez naczyniowych. Badania nad procesem stanowiły główną część rozprawy doktorskiej A. Kuźmińskiej („*Otrzymywanie i modyfikacja powierzchni poliuretanowych cylindrycznych rusztowań tkankowych*”), dla której pełniłam funkcję promotora pomocniczego. Jest to technologia bazująca na procesie inwersji faz w układzie rozpuszczalnik-nerozpuszczalnik, znanym również jako LIPS (ang. *liquid induced phase separation*). Proces LIPS polega na wykorzystaniu różnicy rozpuszczalności polimeru w dwóch roztworach – jednym zawierającym rozpuszczalnik oraz drugim zawierającym tzw. nierozpuszczalnik (55). Podczas stosowania tej metody miesza się oba roztwory, co prowadzi do inwersji faz – wytrącenia polimeru. Otrzymanie trójwymiarowych rusztowań jest możliwe dzięki prowadzeniu procesu przy użyciu kolektorów o odpowiedniej geometrii.

Metoda LIPS ma wiele zalet, w tym zdolność do tworzenia struktur o zróżnicowanej porowatości (dodatek porogenu) oraz łatwość dostosowania procesu do różnych typów polimerów i rozpuszczalników. Stosowanie tej metody do otrzymywania protez naczyniowych jest intensywnie badane przez grupę prof. Seifaliana z University College London (UCL) (56). Jest to Zespół, w którym miałam okazję pracować w trakcie mojego stażu na UCL – umożliwiło mi to poznanie podstawowych technik związanych z tą metodą oraz kontynuowanie badań po powrocie do kraju.

Wpływ głównych parametrów procesowych (skład roztworu nierozpuszczalnika, czas procesu, temperatura procesu, stężenie roztworu PU, twardość PU, dodatek porogenu) wpływających na morfologię protez zostały przedstawione w pracy **A23**. Wybrano warunki, które umożliwiły otrzymanie protez o właściwościach najbliższych założeniom. Opracowane protezy mogą być dodatkowo pokryte włóknami 900 nm, aby utworzyć warstwę zewnętrzną, wspierającą rozwój SMC – analogicznie, jak w przypadku protez otrzymanych techniką SBS. Rozwiązanie to jest obecnie przedmiotem zgłoszenia patentowego (B. Butruk– Raszeja, A. Kuźmińska, M. Wojasiński, „*Sposób otrzymywania polimerowych protez warstwowych i polimerowa proteza warstwowa*”, **Zg11**). W kolejnej pracy (**A25**) przedstawiono właściwości protez uzyskanych metodą inwersji faz i zmodyfikowanych pokryciem z poliakrylanów (opisanym w niniejszym autoreferacie) oraz zbadano wpływ pokrycia na adhezję HUVEC i płytek krwi.

Jestem współautorem dwóch prac przeglądowych prezentujących metody chemicznej modyfikacji powierzchni protez naczyniowych (**A13**, **A40**).

4.9. Pozostałe obszary badawcze

Oprócz prezentowanego w niniejszym autoreferacie głównego nurtu badawczego prowadziłam lub prowadzę badania dotyczące:

- wykorzystania procesu elektropolimeryzacji do wytwarzania pokryć polimerowych na powierzchni metali – promotor pomocniczy rozprawy (Paulina Trzaskowska: „*Procesy modyfikacji powierzchni stalowych przeznaczonych do kontaktu z krwią*”), publikacje **A15**, **A29**
- analizy właściwości polimerów modyfikowanych promieniowaniem E-UV – promotor pomocniczy rozprawy (Inam Ul Ahad, „*Application of laser plasma extreme ultraviolet (EUV) source in biomedical engineering*”), publikacje **A10**, **A19**, **A23**
- otrzymywania materiałów polimerowych metodą inwersji faz w układzie rozpuszczalnik/nierozpuszczalnik – promotor pomocniczy rozprawy (Aleksandra Kuźmińska: „*Otrzymywanie i modyfikacja powierzchni poliuretanowych cylindrycznych rusztowań tkankowych*”), publikacje **A23**, **A25**
- procesów otrzymywania mikrocząstek polimerowych do zastosowań w terapii nowotworów – promotor pomocniczy rozprawy (Ilona Łojszczyk, „*Otrzymywanie mikrocząstek polimerowych do zastosowań medycznych*”)

- modyfikacji i charakteryzacji porowatych membran polipropylenowych – artykuł **A20**
- oceny cytotoksyczności zawiesin komórkowych dozowanych w postaci aerozoli – artykuły **M1, A6**
- metod otrzymywania implantów kostnych (spienianie z reakcją chemiczną oraz formowanie mikrogranulek) – artykuły **A1, A5, A30**
- metod wytwarzania porowatych włókien typu rdzeń-otoczka oraz badania kinetyki wydzielania związków bioaktywnych z takich włókien – promotor pomocniczy rozprawy (Iwona Łopianiak, „*Materiały porowate i włókniste jako rusztowania tkankowe*”)
- metod otrzymywania nowych biotuszy do biodruku 3D – promotor pomocniczy rozprawy (Aleksandra Wojciechowska, „*Wytwarzanie wielowarstwowych struktur do zastosowań w inżynierii regeneracyjnej metodą biodruku 3D*”)
- procesów wytwarzania medycznych pokryć na bazie polidopaminy oraz polinoradrenaliny.

Literatura:

1. Tsao CW, Aday AW, Almarzoq ZI, Alonso A, Beaton AZ, Bittencourt MS, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2022 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*
2. Li MX, Wei QQ, Mo HL, Ren Y, Zhang W, Lu HJ, et al. Challenges and advances in materials and fabrication technologies of small-diameter vascular grafts. *Biomater Res.* 2023;27(1):1–22.
3. Carrabba M, Madeddu P. Current Strategies for the Manufacture of Small Size Tissue Engineering Vascular Grafts. *Front Bioeng Biotechnol.* 2018
4. Dodge JT, Brown BG, Bolson EL, Dodge HT. Lumen diameter of normal human coronary arteries. Influence of age, sex, anatomic variation, and left ventricular hypertrophy or dilation. *Circulation.* 1992; 86(1):232–46.
5. Schanzer A, Hevelone N, Owens CD, Belkin M, Bandyk DF, Clowes AW, et al. Technical factors affecting autogenous vein graft failure: Observations from a large multicenter trial. *J Vasc Surg.* 2007; 46(6):1180–90.
6. Schmitz-Rixen T, Lepidi S, Hamilton G. Compliance: a fundamental biomechanical property in the maintenance of an arterial reconstruction? *Ann Ital Chir.* 1993;64(1):15–27.
7. Meyerson SL, Moawad J, Loth F, Skelly CL, Bassiouny HS, McKinsey JF, et al. Effective hemodynamic diameter: An intrinsic property of vein grafts with predictive value for patency. *J Vasc Surg.* 2000;31(5):910–7.
8. Salacinski HJ, Goldner S, Giudiceandrea A, Hamilton G, Seifalian AM, Edwards A, et al. The mechanical behavior of vascular grafts: A review. *J Biomater Appl.* 2001 Jan;15(3):241–78.
9. Wang W, Nie W, Zhou X, Feng W, Chen L, Zhang Q, et al. Fabrication of heterogeneous porous bilayered nanofibrous vascular grafts by two-step phase separation technique. *Acta Biomater.* 2018;79:168–81.
10. Ju YM, Choi JS, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ. Bilayered scaffold for engineering cellularized blood vessels. *Biomaterials.* 2010;31(15):4313–21.
11. Milleret V, Hefti T, Hall H, Vogel V, Eberli D. Influence of the fiber diameter and surface roughness of electrospun vascular grafts on blood activation. *Acta Biomater.* 2012;8(12):4349–56.
12. Wagenseil JE, Mechem RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev.* 2009;89(3):957–89.
13. Montini-Ballarín F, Calvo D, Caracciolo PC, Rojo F, Frontini PM, Abraham GA, et al. Mechanical behavior of bilayered small-diameter nanofibrous structures as biomimetic vascular grafts. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016 Jul 1;60:220–33.
14. McClure MJ, Sell SA, Simpson DG, Walpoth BH, Bowlin GL. A three-layered electrospun matrix to mimic native arterial architecture using polycaprolactone, elastin, and collagen: A preliminary study. *Acta Biomater.* 2010;6(7):2422–33.
15. Hsieh YF, Sahagian K, Huang F, Xu K, Patel S, Li S. Comparison of plasma and chemical modifications of poly-L-lactide-co-caprolactone scaffolds for heparin conjugation. *Biomed Mater.* 2017;12(6).
16. Mobaraki M, Liu M, Masoud A. Biomedical Applications of Blow-Spun Coatings, Mats, and Scaffolds — A Mini-Review. 2023;1–17.

17. Sripriya R, Kumar MS, Ahmed MR, Sehgal PK. Collagen bilayer dressing with ciprofloxacin, an effective system for infected wound healing. 2012;18(3):335–51.
18. Pimenta FA, Carbonari RC, Malmonge SM. Nanofibrous tubular scaffolds for tissue engineering of small-diameter vascular grafts — development using SBS fabrication technique and mechanical performance. *Res Biomed Eng.* 2022; 38(3):797–811.
19. Akentjew TL, Terraza C, Suazo C, Maksimuck J, Wilkens CA, Vargas F, et al. Rapid fabrication of reinforced and cell-laden vascular grafts structurally inspired by human coronary arteries. *Nat Commun.* 2019;10(1):1–16.
20. Hayama M, Yamamoto K, Kohori F, Uesaka T, Ueno Y, Sugaya H, et al. Nanoscopic behavior of polyvinylpyrrolidone particles on polysulfone/polyvinylpyrrolidone film. *Biomaterials.* 2004;25(6):1019–28.
21. Deng Z, Zhang Z, Li L, Zhou C. Biocompatibility evaluation of chitosan-g-polyvinylpyrrolidone. *Acad J first Med Coll PLA.* 2004;24(6):639–41, 645.
22. Leone G, Consumi M, Greco G, Bonechi C, Lamponi S, Rossi C, et al. A PVA/PVP hydrogel for human lens substitution: Synthesis, rheological characterization, and in vitro biocompatibility. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2011;97(2):278–88.
23. Hwang S, Jeong S. Electrospun nano composites of poly(vinyl pyrrolidone)/ nano-silver for antibacterial materials. *J Nanosci Nanotechnol.* 2011;11(1):610–3.
24. Biazar E, Roveimiab Z, Shahhosseini G, Khataminezhad M, Zafari M, Majdi A. Biocompatibility evaluation of a new hydrogel dressing based on polyvinylpyrrolidone/polyethylene glycol. *J Biomed Biotechnol.* 2012
25. Kwon T, Woo HJ, Kim YH, Lee HJ, Park KH, Park S, et al. Optimizing hemocompatibility of surfactant-coated silver nanoparticles in human erythrocytes. *J Nanosci Nanotechnol.* 2012;12(8):6168–75.
26. Wang H, Yu T, Zhao C, Du Q. Improvement of hydrophilicity and blood compatibility on polyethersulfone membrane by adding polyvinylpyrrolidone. *Fibers Polym.* 2009;10(1):1–5.
27. Francois P, Vaudaux P, Nurdin N, H. M, Descouts P, Lew D. Physical and biological effects of a surface coating procedure on polyurethane catheters. *Biomaterials.* 1996;17:667–78.
28. Liu X, Wu Z, Li D, Chen H. Poly(N-vinylpyrrolidone)-modified surfaces repel plasma protein adsorption. *Chinese J Polym Sci.* 2012;30(2):235–41.
29. Sanak M, Jakiela B, Węgrzyn W. Assessment of hemocompatibility of materials with arterial blood flow by platelet functional tests. *Bull Polish Acad Sci.* 2010;58(2):317–22.
30. Li B, Chen J, Wang JH-C. RGD peptide-conjugated poly(dimethylsiloxane) promotes adhesion, proliferation, and collagen secretion of human fibroblasts. *J Biomed Mater Res A.* 2006;79(4):989–98.
31. Lin HB, García-Echeverría C, Asakura S, Sun W, Mosher DF, Cooper SL. Endothelial cell adhesion on polyurethanes containing covalently attached RGD-peptides. *Biomaterials.* 1992;13(13):905–14.
32. Chollet C, Chanseau C, Brouillaud B, Durrieu MC. RGD peptides grafting onto poly(ethylene terephthalate) with well controlled densities. *Biomol Eng.* 2007;24:477–82.
33. Davis DH, Giannoulis CS, Johnson RW, Desai T a. Immobilization of RGD to silicon surfaces for enhanced cell adhesion and proliferation. *Biomaterials.* 2002 Oct;23(19):4019–27.
34. Tugulu S, Silacci P, Stergiopoulos N, Klok H-A. RGD-Functionalized polymer brushes as substrates for the integrin specific adhesion of human umbilical vein endothelial cells. *Biomaterials.* 2007;28(16):2536–46.
35. Salacinski HJ, Hamilton G, Seifalian AM. Surface functionalization and grafting of heparin and/or RGD by an aqueous-based process to a poly(carbonate-urea)urethane cardiovascular graft for cellular engineering applications. *J Biomed Mater Res A.* 2003 Sep 1;66(3):688–97.
36. Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials.* 2003;24(24):4353–64.
37. Goddard JM, Hotchkiss JH. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Prog Polym Sci.* 2007;32(7):698–725.
38. Hermanson GT. *Bioconjugate Techniques.* Academic Press; 2008. 1202 p.
39. Pourjavadi A, Mahdavinia GR, Omidian H. Modified Chitosan . Optimized Cerium Ammonium Nitrate-Induced Synthesis of Chitosan-graft- Polyacrylonitrile. *J Appl Polym Sci.* 2003;88(8):2048–54.
40. Chansook N, Kiatkamjornwong S. Ce (IV) -Initiated Graft Polymerization of Acrylic Acid onto Poly (ethylene terephthalate) *Fiber.* 2002
41. Van Andel CJ, Pistecy P V., Borst C. Mechanical properties of porcine and human arteries: Implications for coronary anastomotic connectors. *Ann Thorac Surg.* 2003;76(03):58–64.
42. Wojasiński M, Pilarek M, Ciach T. Comparative studies of electrospinning and solution blow spinning processes for the production of nanofibrous poly(L-Lactic Acid) materials for biomedical engineering. *Polish J Chem Technol.* 2014;16(2):43–50.

43. Khan M, Hassan M. Solution blow spinning (sbs): A promising spinning system for submicron/nanofibre production. *Text Leather Rev.* 2021;4(3):181–200.
44. Wang H-S, Fu G-D, Li X-S. Functional Polymeric Nanofibers from Electrospinning. *Recent Pat Nanotechnol.* 2008 Dec 31;3(1):21–31.
45. Daristotle JL, Behrens AM, Sandler AD, Kofinas P. A Review of the Fundamental Principles and Applications of Solution Blow Spinning. Vol. 8, *Physiology & behavior.* 2019. 678–687 p.
46. Łopianiak I, Wojasiński M, Butruk-Raszeja B. Properties of polyurethane fibrous materials produced by solution blow spinning. *Chem Process Eng - Inz Chem i Proces.* 2020;41(4):267–76.
47. Czarnecka K, Wojasiński M, Ciach T, Sajkiewicz P. Solution Blow Spinning of Polycaprolactone—Rheological Determination of Spinnability and the Effect of Processing Conditions on Fiber Diameter and Alignment. *Materials.* 2021 Mar;14(6):1463.
48. Horakova J, Klicova M, Erben J, Klapstova A, Novotny V, Behalek L, et al. Impact of Various Sterilization and Disinfection Techniques on Electrospun Poly-ε-caprolactone. *ACS omega.* 2020 Apr 21;5(15):8885–92.
49. Braghirolli DI, Steffens D, Quintiliano K, Acasigua GAX, Gamba D, Fleck RA, et al. The effect of sterilization methods on electrospun poly(lactide-co-glycolide) and subsequent adhesion efficiency of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater.* 2014;102(4):700–8.
50. Nguyen AT, Sathe SR, Yim EKF. From nano to micro: Topographical scale and its impact on cell adhesion, morphology and contact guidance. *J Phys Condens Matter.* 2016;28(18).
51. Chung TW, Liu DZ, Wang SY, Wang SS. Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale. *Biomaterials.* 2003;24(25):4655–61.
52. Rüder C, Sauter T, Kratz K, Haase T, Peter J, Jung F, et al. Influence of fibre diameter and orientation of electrospun copolyetheresterurethanes on smooth muscle and endothelial cell behaviour. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2013;55(4):513–22.
53. Xu C, Yang F, Wang S, Ramakrishna S. In vitro study of human vascular endothelial cell function on materials with various surface roughness. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2004;71(1):154–61.
54. Maleki S, Shamloo A, Kalantarnia F. Tubular TPU/SF nanofibers covered with chitosan-based hydrogels as small-diameter vascular grafts with enhanced mechanical properties. *Sci Rep.* 2022;12(1):1–15.
55. Cholewa-Kowalska K. Wybrane metody otrzymywania porowatych rusztowań w inżynierii tkankowej. *Acta Bio-Optica Inform Medica Inżynieria Biomed.* 2014;20(4):193–203.
56. Ahmed M, Ghanbari H, Cousins BG, Hamilton G, Seifalian AM. Small calibre polyhedral oligomeric silsesquioxane nanocomposite cardiovascular grafts: influence of porosity on the structure, haemocompatibility and mechanical properties. *Acta Biomater.* 2011;7(11):3857–67.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Współpraca międzynarodowa

- **Section of Experimental Oncology and Nanomedicine (SEON), Universitätsklinikum Erlangen, Friedrich–Alexander University Erlangen–Nürnberg (FAU), Erlangen, Niemcy** – współpraca rozpoczęta w trakcie realizacji projektu BioGraft, w ramach współpracy zrealizowałam 3 miesięczny staż (2022, grant wyjazdowy w ramach konkursu Bekker, NAWA), efektem stażu jest publikacja (**H8**) oraz dwa wystąpienia konferencyjne; obecnie współpraca jest kontynuowana w ramach wspólnego projektu (OPUS-LAP, NCN), projekt zakłada kontynuację badań nad protezami naczyniowymi, 2 manuskrypty są w przygotowaniu, złożyliśmy wspólny wniosek do NAWy o finansowanie dwustronnej wymiany akademickiej między Zespołami (wniosek w trakcie oceny)

- **National Taiwan University of Science and Technology, Taipei, Taiwan** – współpraca w ramach realizacji dwóch projektów (NCBiR, Współpraca Polsko-Tajwańska), efekty współpracy to 3 wspólne publikacje (**A13, A16, A40**)
- **Centre of Nanotechnology and Regenerative Medicine, University College London, Londyn, Wielka Brytania** – odbyłam 2-miesięczny staż (2010, grant wyjazdowy Centrum Studiów Zaawansowanych PW), podczas którego miałam okazję poznać techniki hodowli komórkowych na powierzchni biomateriałów oraz techniki analizy właściwości biomateriałów

Współpraca krajowa

- **Instytut Optoelektroniki, Wojskowa Akademia Techniczna (WAT), Warszawa** – współpraca z grupą prof. Fiedorowicza nad zagadnieniami związanymi z badaniem właściwości materiałów modyfikowanych promieniowaniem E-UV, w ramach współpracy pełniłam funkcję promotra pomocnicznego (Inam Ul Ahad), dwoje moich dyplomantów zrealizowało badania do prac dyplomowych z wykorzystaniem unikalnego sprzętu dostępnego w Instytucie (Julia Zakrzewska, *“Biozgodność polimerów modyfikowanych z zastosowaniem promieniowania E-UV”*, 2020, praca inż., Adam Lech, *“Wpływ parametrów procesowych na biozgodność mat modyfikowanych promieniowaniem E-UV”*, 2020, praca mgr), odbyłam szkolenie *“Laser Plasma EUV Sources for Application in Nanotechnology and Bioengineering”*(2012), powstały 3 wspólne publikacje (**A10, A19, A23**), badania prowadzone były w ramach projektów Laserlab-Europe finansowanych z programów europejskich 7PR oraz Horyzont 2020
- **Instytut Inżynierii Materiałowej i Metalurgii (IMIM) PAN, Kraków** – współpraca z zespołem dr hab. Majora, zespół posiada m.in. układy przepływowe do analizy interakcji materiał-krew, z układów tych korzystałam podczas analiz wytwarzanych przeze mnie materiałów i powierzchni, współpraca była realizowana podczas 3 projektów finansowanych ze środków NCBiR i NCN, efektem współpracy jest 1 wspólna publikacja **A39**
- **Instytut Fizyki, Warszawa** – współpraca z grupą prof. Jabłońskiej-Ławniczak, w ramach współpracy zespół przeprowadza analizę XPS badanych przeze mnie powierzchni i materiałów, efektem współpracy są 3 publikacje **A19, A23, A29**
- **Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii (FRK), Zabrze** – współpraca przy realizacji Projektu Polskie Sztuczne Serce, FRK produkowała komory wspomaganie serca, które w ramach projektu poddawałam modyfikacjom powierzchniowym oraz wykonywała badania *in vivo* opracowanych przeze mnie materiałów, efektem współpracy jest wspólna publikacja (**H2**)

Współpraca wewnętrzna w ramach PW

- współpracuję z grupą prof. Janczeskiego z **Wydziału Chemicznego PW**, w ramach współpracy badam właściwości hemolityczne nowych polimerów o działaniu antybakteryjnym; efektem współpracy jest wspólna publikacja **A28**
- kontynuuję współpracę z dr Pauliną Trzaskowską, rozpoczętą jeszcze na etapie realizacji jej pracy magisterskiej (pełniłam funkcję opiekuna) oraz pracy doktorskiej (pełniłam funkcję promotora pomocniczego), obecnie dr Trzaskowska pracuje w **CEZAMAT PW** i zajmuje się m.in. modyfikacją powierzchni metali do zastosowań biomedycznych; efektem współpracy są wspólne publikacje **A15, A29**.
- w ramach **WICHIP** współpracuje m.in. z grupą prof. Moskala nad zagadnieniami związanymi z syntezą i modyfikacją nanocelulozy bakteryjnej do zastosowań biomedycznych oraz grupą prof. Makowskiego analizując wpływ geometri przewężenia w modelowych naczyniach krwionośnych na procesy hemolizy

Oświadczenia potwierdzające współpracę i odbycie staży zawiera **Załącznik 7**.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Moja działalność dydaktyczna związana jest z Wydziałem Inżynierii Chemicznej i Procesowej (WICHIP) oraz Wydziałem Chemicznym (WCh) Politechniki Warszawskiej. Prowadzę zajęcia na I (Biotechnologia, WCh) oraz II stopniu (spec. Bioinżynieria oraz spec. Inżynieria Produktów Nanostrukturalnych, WICHIP) studiów stacjonarnych.

Prowadzone zajęcia

Biotechnologia:

- Kultury komórkowe i tkankowe roślin i zwierząt – laboratorium, 30h (współprowadząca)

Inżynieria chemiczna i procesowa, spec. Bioinżynieria:

- Hodowle komórkowe – wykład, 30h + laboratorium, 30h (kierownik przedmiotu, przedmiot prowadzony samodzielnie)
- Nanotechnologia – wykład, 30h + laboratorium, 30h (kierownik przedmiotu, wykład prowadzony samodzielnie, laboratorium współprowadząca)
- Inżynieria Biomedyczna – laboratorium, 30h (prowadzone samodzielnie)

Inżynieria chemiczna i procesowa, spec. Inżynieria Produktów Nanostrukturalnych:

- Nanotechnologia medyczna – laboratorium, 60h (współprowadząca)

Wszystkie prowadzone przeze mnie zajęcia dydaktyczne są zajęciami autorskimi - opracowałam materiały wykładowe, program zajęć laboratoryjnych oraz instrukcje do ćwiczeń. Materiały dydaktyczne są przeze mnie aktualizowane – np. w momencie pojawienia się nowego sprzętu w laboratorium, tak, aby studenci mieli możliwie najlepszy dostęp do nowoczesnych technik.

Laboratoria z hodowli komórkowych (KKiTRiZ oraz Hodowle komórkowe) prowadzone są w laboratorium dydaktycznym typu *clean-room*. Jest to laboratorium, które powstało na WICHiP PW w 2015 roku przy moim aktywnym udziale – brałam udział w projektowaniu (m.in. projekt 10-osobowej dydaktycznej komory laminarnej) oraz wyposażaniu laboratorium w niezbędne sprzęty i materiały.

Pełniłam funkcję promotora w 40 pracach dyplomowych zrealizowanych na WICHiP: 26 pracach magisterskich oraz 14 pracach inżynierskich. Obecnie w realizacji jest kolejnych 6 prac dyplomowych.

Prace magisterskie

1. Analiza właściwości biologicznych pokryć biomedycznych zawierających taurynę, 2023
2. Badanie procesu wydruku polimerowych struktur cylindrycznych do zastosowań w inżynierii tkankowej, 2023
3. Wpływ dodatku substancji modyfikujących na wzrost ludzkich komórek na materiałach włóknistych, 2022
4. Wpływ stopnia uporządkowania włókien na wzrost komórek mięśni gładkich, 2021
5. Analiza wzrostu komórek na nanowłóknach z dodatkiem białek, 2021
6. Pokrycia do urologicznych wyrobów medycznych zmniejszające wartości współczynników tarcia z tkankami układu moczowego, 2021
7. Hodowla wybranych typów komórek na powierzchni włóknistych protez naczyniowych, 2021
8. Wzrost i aktywność komórek hodowanych na powierzchni protez naczyniowych w warunkach dynamicznych, 2021
9. Wpływ parametrów procesowych na otrzymywanie bioaktywnego pokrycia polimerowego, 2021
10. Otrzymywanie nanocząstek tlenku grafenu metodą karbonizacji, 2020
11. Wpływ parametrów procesowych na biogodność materiałów modyfikowanych promieniowaniem EUV, 2020
12. Opracowanie struktur nano- i mikrowłóknistych do trójwymiarowej hodowli komórkowej, 2019
13. Wpływ celowej modyfikacji chemicznej na własności mechaniczne i fizykochemiczne włóknistych protez naczyniowych, 2019
14. Ocena właściwości fizykochemicznych i biologicznych mikrocząstek do terapii nowotworowej, 2018
15. Otrzymywanie i badanie protez naczyń krwionośnych, 2018
16. Biokompatybilne pokrycie poliuretanów, 2018
17. Otrzymywanie i badanie bioaktywnych pokryć peptydowych, 2018
18. Wytwarzanie mikrocząstek polimerowych techniką membranową do zastosowań medycznych, 2018

19. Otrzymywanie biogodnych materiałów polimerowych do długotrwałego kontaktu z krwią, 2018
20. Biogodność polimerowych protez naczyniowych, 2018
21. Biokompatybilność sztucznych naczyń krwionośnych, 2017
22. Otrzymywanie mikrocząstek polimerowych do embolizacji naczyń krwionośnych w terapii nowotworów, 2017
23. Własności bioaktywnych powierzchni poliuretanów medycznych, 2017
24. Opracowanie metody wytwarzania oraz wstępna analiza właściwości protez naczyniowych małych średnic, 2016
25. Hemokompatybilność modyfikowanych powierzchni poliuretanów medycznych, 2015
26. Bioactive surfaces promoting endothelial cells adhesion, 2015

Prace inżynierskie

1. Modyfikacja celulozy bakteryjnej - analiza składu chemicznego produktu, 2023
2. Wpływ parametrów procesowych na morfologię polimerowych cylindrycznych rusztowań biomedycznych otrzymywanych techniką inwersji faz, 2022
3. Analiza właściwości mechanicznych wielowarstwowych struktur mikro/nanowłóknistych, 2022
4. Badanie procesu adhezji płytek krwi do powierzchni modyfikowanych polidopaminą, 2022
5. Analiza wpływu wybranych parametrów procesowych na właściwości fizykochemiczne otrzymanych biomateriałów włóknistych, 2021
6. Właściwości mechaniczne polimerowych materiałów włóknistych, 2020
7. Biogodność polimerów modyfikowanych z zastosowaniem promieniowania E-UV, 2020
8. Otrzymywanie rusztowań tkankowych metodą wypierania rozpuszczalnika, 2019
9. Hydrożelowe powłoki do zastosowań medycznych, 2019
10. Biomarkery aktywności komórek śródbłonna w warunkach in vitro, 2019
11. Analiza metabolizmu komórek śródbłonna na polimerowym biomateriale, 2017
12. Wpływ parametrów reakcji na gęstość powierzchniową grup karboksylowych na bioaktywnej powierzchni polimerowej, 2016
13. Analiza procesów wykrzepiania krwi w kontakcie z powierzchnią polimeru medycznego, 2015
14. Badanie zwilżalności powierzchni poliuretanu funkcjonalizowanego grupami aminowymi i karboksylowymi, 2015

Pełnię/pełniłam funkcję promotora pomocniczego w następujących przewodach doktorskich:

1. Inam Ul Ahad, „*Application of laser plasma extreme ultraviolet (EUV) source in biomedical engineering*”, nadanie stopnia doktora: 2015 r.
2. Paulina Trzaskowska: „*Procesy modyfikacji powierzchni stalowych przeznaczonych do kontaktu z krwią*”, nadanie stopnia doktora: 2018 r., wyróżnienie
3. Ilona Łojarczyk, „*Otrzymywanie mikrocząstek polimerowych do zastosowań medycznych*”, nadanie stopnia doktora: 2021 r.
4. Aleksandra Kuźmińska: „*Otrzymywanie i modyfikacja powierzchni poliuretanowych cylindrycznych rusztowań tkankowych*”, nadanie stopnia doktora: 2022

5. Iwona Łopianiak, „*Materiały porowate i włókniste jako rusztowania tkankowe*”, planowana obrona: 2024
6. Aleksandra Wojciechowska, „*Wytwarzanie wielowarstwowych struktur do zastosowań w inżynierii regeneracyjnej metodą biodruku 3D*”, w realizacji od 2022

Nagrody przyznane dyplomantom w konkursie Polskiego Towarzystwa Inżynierii Biomedycznej na najlepszą pracę magisterską:

- mgr inż. Karolina Paszkowska „Otrzymywanie i badanie bioaktywnych powłok peptydowych” (wyróżnienie, 2018)
- mgr inż. Martyna Banach „Wytwarzanie mikrocząstek polimerowych techniką membranową do zastosowań medycznych” (wyróżnienie, 2018)

Pozostała działalność dydaktyczno-popularyzatorska:

- recenzent prac magisterskich (5) oraz prac inżynierskich (19) realizowanych na WICHiP
- opiekun studentów uczestniczących w programie Erasmus (2 studentki)
- opiekun ucznia realizującego staż licealisty (1 studentka)
- wykład na Uniwersytecie Trzeciego Wieku prezentujący tematykę sztucznego serca, 2014
- wywiad radiowy prezentujący tematykę protez naczyniowych, Polskie Radio 24, Program Czas na Naukę, 2018
- wywiad radiowy prezentujący projekt BioGraft, Radio Czwórka, Program Stacja Nauki, 2018

Działalność organizacyjna:

- kierownik Laboratorium Inżynierii Powierzchni i Protez Naczyniowych (BioGraftLab)
- opiekun laboratorium badawczego

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Otrzymane granty wyjazdowe:

- Grant wyjazdowy w ramach **Programu Bekker Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej** (2022), w ramach stypendium zrealizowałam staż naukowy w Section of Experimental Oncology and Nanomedicine (SEON), Universitätsklinikum Erlangen, Niemcy
- Naukowe Stypendium Wyjazdowe **Centrum Studiów Zaawansowanych Politechniki Warszawskiej** (2009), w ramach stypendium zrealizowałam staż naukowy w Centre of Nanotechnology and Regenerative Medicine, University College London, Wielka Brytania

Odbyte szkolenia:

- Warsztat Aktywnej Dydaktyki, Uniwersytet Otwarty Uniwersytetu Warszawskiego, 5.11.2014
- Analiza danych w programie STATISTICA, StatSoft, Warszawa, 16.10.2012
- Zastosowania statystyki i data mining w badaniach naukowych, StatSoft, Warszawa, 15.10.2012
- Nanotechnology Summer School, University of Oxford, Oxford, Wielka Brytania, 2-6.07.2012
- Hodowle komórkowe – oczyszczanie białek i analiza komórek, Merck Millipore, Warszawa, 14.06.2012
- Laser Plasma EUV Sources for Application in Nanotechnology and Bioengineering, Instytut Optoelektroniki, Wojskowa Akademia Techniczna, Warszawa, 19-20.04.2012
- Zarządzanie projektami, Centrum Studiów Zaawansowanych Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 2-4.12.2010
- Zarządzanie zasobami ludzkimi, Centrum Studiów Zaawansowanych Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 30.11-1.12.2010
- HPLC i techniki łączone w biotechnologii, Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 16-24.05.2009
- Kurs Hodowli Komórek Zwierzęcych, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa, 9-12.06.2008

Otrzymane nagrody:

- Nominacja do Polskiej Nagrody Inteligentnego Rozwoju 2020 w kategorii Naukowiec Przyszłości za realizację projektu „BioGraft – biomimetyczne protezy naczyniowe małych średnic” (2020)
- Nagroda Rektora Politechniki Warszawskiej za wybitne osiągnięcia w nauce (2015)
- Nagroda za najlepszy plakat na I Sympozjum Biomedycznym Eskulap w Lublinie (2014)
- II miejsce w sesji posterowej, kategoria "Młodzi badacze", za plakat pt. "Otrzymywanie nowoczesnych biomateriałów do kardiochirurgii metodą inżynierii tkankowej", XXI Ogólnopolska Konferencja Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Kołobrzeg (2013)
- Wyróżnienie za plakat „Biopassive coating for polyurethane cardiovascular devices”, 8th PhD Students and Young Scientists Conference R&D Conference, Warszawa (2013)
- Stypendium w ramach II edycji projektu “Potencjał naukowy wsparciem dla gospodarki Mazowska – stypendia dla doktorantów” (rok akademicki: 2012/2013)
- Stypendium Rektora dla najlepszych doktorantów (lata akademickie: 2009/2010, 2010/2011, 2011/2012)
- Naukowe Stypendium Doktoranckie Centrum Studiów Zaawansowanych Politechniki Warszawskiej (lata akademickie 2010/2011 oraz 2011/2012)
- Mazowieckie Stypendium Doktoranckie Urzędu Marszałkowskiego Województwa Mazowieckiego (2010)
- Nagroda Scopus-Perspektywy Young Researcher Award (2010)
- Wyróżnienie za plakat “Hydrogel coating for polyurethanes”, Conference on Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine, Rytro (2010)

Kopie dokumentów potwierdzające wybrane osiągnięcia zawiera **Załącznik 8**.