



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I KOMPOZYTÓW

Prof. dr hab. inż. **Elżbieta PAMUŁA**

Kraków, 7 sierpnia 2020

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr ANETY PIETRASZEK
pt. *"Bioaktywny układ halozyt-fosfataza alkaliczna jako składnik
rusztowań hydrożelowych do leczenia ubytków kostnych"*
zrealizowanej pod kierunkiem
Pani promotor dr hab. Anny Karewicz

Recenzja została opracowana na podstawie decyzji
Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego
oraz zlecenia Dziekana Wydziału Chemii
Pana prof. dra hab. Piotra Kuśtrowskiego z dnia 8 czerwca 2020

Zmiany demograficzne objawiające się wydłużeniem średniej oczekiwanej długości życia, a co za tym idzie pogorszeniem stanu tkanek, w tym tkanki kostnej oraz wrastająca liczba przypadków urazów, wymagają opracowania nowych rozwiązań terapeutycznych, opartych na medycynie regeneracyjnej i inżynierii tkankowej. Podejście to wymaga zaprojektowania biomateriałów nowej generacji, które oprócz funkcji podporowej dla tkanki kostnej będą w stanie pełnić rolę sztucznej matrycy zewnątrzkomórkowej, sprzyjającej adhezji komórek osteogennych, ich wzrostowi oraz różnicowaniu oraz doprowadzą do odbudowy funkcjonalnej kości.

Pani mgr Aneta Pietraszek za cel swojej pracy doktorskiej postawiła opracowanie porowatych hybrydowych rusztowań dla inżynierii tkanki kostnej na bazie chitozanu i kolagenu typu I, czyli biopolimerów należących do dwóch grup, tj. polisacharydów i białek. Dodatkowo rusztowania te wzbogacone zostały w nanocząstki



WIMiC

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

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

haloizytu (HAL) załadowane enzymem zaangażowanym w proces mineralizacji, czyli w fosfatazę alkaliczną (ALP). Podejście autorki jest trafne i oryginalne a także wpisuje się w tzw. „*podejście biomimetyczne*”, tj. opierające się na naśladownictwie natury i projektowaniu biomateriałów, których budowa i właściwości jak najbardziej zbliżone są do naturalnych struktur tkankowych. Tematyka podjęta przez Doktorantkę jest w pełni uzasadniona, gdyż wynika z zapotrzebowania na nowej generacji biomateriały wspierające odbudowę i leczenie ubytków tkanki kostnej.

Praca została zredagowana w języku polskim i liczy w sumie 159 stron. Na początku znajduje się *Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wykaz skrótów użytych w pracy, Wprowadzenie, założenia i cele pracy – hipoteza badawcza*, a następnie na 31 stronach Autorka zamieściła *Cześć literaturową*. Cześć eksperymentalna podzielona została na trzy części: *Część I to Charakterystyka fizykochemiczna układu ALP-HAL (39 str.)*, *Część II to Bioaktywne rusztowania hydrożelowe z ALP-HAL do naprawy ubytków kostnych (30 str.)* i *Część III to Drukowanie rusztowań CH i C-CH zawierających HAL (12 str.)*. Następnie umieszczono *Podsumowanie*, spis 175 pozycji literaturowych, spis rysunków i tabel oraz wykaz dorobku naukowego Doktorantki.

Pracę charakteryzuje bardzo dobra proporcja pomiędzy częścią literaturową i doświadczalną. Większość zacytowanych pozycji literaturowych pochodzi z kilku ostatnich lat, co świadczy o aktualności podjętej tematyki przez Doktorantkę.

We *Wprowadzeniu* Autorka najpierw ogólnie opisała rodzaje rusztowań do naprawy tkanki kostnej podkreślając wymagania biologiczne, mechaniczne i strukturalne, jakie muszą być spełnione, aby rusztowanie takie wypełniło swoją funkcję. Następnie pokrótce zreferowała, jakie biomateriały stosuje się do naprawy tkanki kostnej uwzględniając metale, ceramikę i polimery. W dalszej części, już dokładniej, scharakteryzowała materiały wykorzystane w pracy,

a więc chitozan i kolagen, jako elementy matrycy oraz genipinę, jako biogodny związek użyty do ich sieciowania. Dużo miejsca poświęciła haloizytowi – minerałowi ilastemu, który wykorzystwała jako modyfikator matrycy polimerowej – opisując jego budowę, właściwości fizykochemiczne a także wykorzystanie jako nośnika leków i substancji biologicznie aktywnych oraz składnika rusztowań do odbudowy tkanki kostnej.

Ta część pracy jest bardzo dobrze zredagowana, choć można znaleźć w niej drobne błędy i nieścisłości, takie jak średni rozmiar porów w rusztowaniach dla inżynierii tkanki kostnej to 300 μm a nie 300 nm jak przedstawiono na Rysunku 2. Zastanawiające jest też, że na str. 38 Autorka pisze, iż porowatość haloizytu to 50-60 cm^2/g , jednak porowatość wyznacza się w procentach. Być może Autorce chodziło o rozwinięcie powierzchni, które w przypadku haloizytu wynosi nawet 100 m^2/g , jednak skąd wzięła się w takim razie jednostka cm^2/g ?

W dalszej części tego rozdziału Doktorantka skupiła się na fosfatazie alkalicznej opisując jej budowę, właściwości, metody oznaczania aktywności enzymatycznej, rolę w procesie biomineralizacji kości oraz próby jej wykorzystania w inżynierii tkanki kostnej. Następnie jeden podrozdział poświęciła metodom druku 3D kompozytów polimerowych.

Oprócz wymienionych powyżej, nie mam zastrzeżeń ani natury merytorycznej ani edytorskiej do tej części pracy. Chciałabym podkreślić, że część literaturowa rozprawy została bardzo dobrze zredagowana, a treści w niej zawarte znajdują pełne uzasadnienie w kontekście tematyki rozprawy doktorskiej.

Część Eksperymentalna ma formę trzech artykułów naukowych zawierających krótkie wprowadzenie, opis stosowanych odczynników, aparatury, metod badawczych oraz procedur eksperymentalnych. Następnie prezentowane i dyskutowane są wyniki a każdy z rozdziałów kończy podsumowanie.

W Części Eksperymentalnej I Doktorantka scharakteryzowała właściwości fizykochemiczne układu ALP-HAL. Za największe osiągnięcie tej części pracy można uznać opracowanie oryginalnej metody immobilizacji ALP we wnętrzu nanorurek HAL i wykazanie, że dzięki niej ALP wykazuje aktywność w bardzo szerokim zakresie pH (od 1 do 10) w odniesieniu do wolnego ALP (aktywność zachowana przy pH w zakresie od 7 do 10). Autorka tłumaczy to budową wnętrza nanorurek HAL, w których ze względu na amfoteryczny charakter tlenku glinu, lokalne pH jest inne niż środowiska zewnętrznego, dzięki czemu HAL może pełnić rolę ochronną i stabilizującą strukturę enzymu, a co za tym idzie przeciwdziałającą utracie jego aktywności enzymatycznej. Kolejne osiągnięcie tej części pracy dotyczy zachowania aktywności enzymatycznej zaimmobilizowanego ALP w podwyższonej temperaturze aż do 90 °C (w porównaniu z temperaturą około 60 °C dla wolnego enzymu), co umożliwia wykorzystanie m.in. wysokotemperaturowych metod przetwórstwa oraz termicznych metod sterylizacji opracowanego biomateriału. Udowodniono też, że aktywność enzymatyczna ALP w układzie ALP-HAL jest odpowiednia do zainicjowania procesu biomineralizacji, w wyniku której powstaje faza mineralna – fosforany wapnia, w tym niskokrystaliczny hydroksyapatyt o budowie takiej jak w tkance kostnej. Wyniki opisane w powyższym rozdziale zostały opublikowane w bardzo dobrym czasopiśmie *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces* 173, 2019, 1-8.

Z obowiązku recenzentki chciałabym tylko zwrócić uwagę na kilka błędów: na Rysunku 19 podpis powinien brzmieć „Liczba falowa” a nie „Długość fali”, w Tabeli 8 gęstość pozorną należało wyrazić w g/cm³ a nie cm³/g, zaś na Rysunku 27 brak jest legendy.

W Części Eksperymentalnej II Doktorantka wykorzystała opracowany w Części I układ ALP-HAL do uzyskania kompozytowych rusztowań o matrycy chitozanowej i chitozanowo-kolagenowej sieciowanych *in situ* genipiną. Przeprowadziła szereg badań rusztowań, które obejmowały ocenę ich pęcznienia, analizę

mikrostruktury, porowatości i wielkości porów, badania reologiczne, badania degradacji, mineralizacji i w końcu badania w kontakcie z komórkami osteoblastopodobnymi. Uzyskane wyniki pozwoliły na wyciągnięcie wniosków, że obecność ALP-HAL wpływa korzystnie na wzrost porowatości i wielkości porów w rusztowaniach na bazie kolagenu i chitozanu; poprawia też właściwości reologiczne i stymuluje proces biomineralizacji. Badania biologiczne wykazały, że uzyskane rusztowania sprzyjają adhezji i proliferacji komórek *in vitro*, przez co stanowią obiecujący materiał do regeneracji tkanki kostnej. Artykuł opisujący powyższe wyniki został ostatnio przyjęty do publikacji w *International Journal of Biological Macromolecules*, co również świadczy, że prace Doktorantki są oryginalne i uzyskały akceptację międzynarodowego środowiska naukowego.

Studiując powyższą część pracy zaintrygowało mnie stwierdzenie Doktorantki ze str. 112, że „*Istnieją obawy, iż zbyt wysoka zawartość nanorurek HAL może wpływać niekorzystnie na biogodność otrzymanych hydrożeli*”. Czy mogłaby Doktorantka, już w czasie publicznej obrony, rozwinąć tę hipotezę i poprzeć ją doniesieniami literaturowymi lub własnymi spostrzeżeniami czy wynikami badań? Podobnie zastanawia mnie inne stwierdzenie Doktorantki, tym razem ze str. 120, że „*wysokie kąty zwilżania materiału (ponad 100°) sprzyjają adhezji osteoblastów*”. Czy Doktorantka mogłaby poprzeć to stwierdzenie jakimiś najnowszymi doniesieniami literaturowymi, gdyż prace, do których miałam dotychczas dostęp wskazywały, że pośrednie wartości kątów zwilżania, a więc około 70° są najkorzystniejsze do hodowli komórek powierzchniowo-zależnych?

W *Części Eksperymentalnej III* Doktorantka zajęła się drukiem 3D rusztowań z kompozytów opracowanych w *Części II*, tj. matryc chitozanowych i chitozanowo-kolagenowych zawierających ALP-HAL. Opisane wyniki zostały uzyskane w czasie 3-tygodniowego stażu w zespole Prof. Michaela Gelinsky'ego w Dreźnie. Chociaż uzyskane wydruki wymagałyby dalszej optymalizacji warunków procesu druku

3D, z uwagi na niezbyt dobre parametry mechaniczne, to wskazują one na duży potencjał opracowanych materiałów w kontekście inżynierii tkanki kostnej i stanowią bardzo ciekawy kierunek dalszych badań, które Doktorantka mogłaby rozwijać w przyszłości.

W Podsumowaniu rozprawy doktorskiej Autorka zebrała wszystkie najważniejsze osiągnięcia swojej pracy i nakreśliła dalsze plany badawcze, co świadczy o jej dojrzałości naukowej i umiejętności syntetycznego spojrzenia na uzyskane wyniki badań.

Pomimo kilku uwag o charakterze redakcyjnym i językowym, z uznaniem muszę przyznać, że praca doktorska Pani mgr Anety Pietraszek została napisana bardzo ładnym językiem i stanowi przykład dobrze przemyślanych i zrealizowanych eksperymentów naukowych. Dowodzi ona, że Doktorantka ze swobodą porusza się w zagadnieniach dotyczących biomateriałów kompozytowych przeznaczonych dla inżynierii tkanki kostnej i ma w tym zakresie już wymierne osiągnięcia naukowe. Wyniki opisane w pracy mogą stanowić podstawę do wykorzystania w przyszłości opracowanych biomateriałów w bardziej zaawansowanych badaniach biologicznych *in vitro*, badaniach doświadczalnych na zwierzętach a potem w badaniach klinicznych. Przytoczone w recenzji sugestie i uwagi krytyczne są w zasadzie natury edytorskiej lub stanowią zaproszenie do dyskusji naukowej. Nie wpływają one na moją wysoką ocenę merytoryczną recenzowanej rozprawy.

Uważam, że recenzowana rozprawa doktorska, tak ze względu na wartości naukowe, znaczenie poznawcze i aplikacyjne oraz wysoki poziom warsztatu naukowego, spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789) oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz.

16669) i w związku z tym wnoszę o jej przyjęcie oraz dopuszczenie Pani mgr Anety Pietraszek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy i jakość rozprawy doktorskiej, dorobek doktorantki obejmujący publikacje z tzw. listy filadelfijskiej oraz spełnienie pozostałych wymagań obowiązujących na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

A handwritten signature in purple ink, appearing to read 'E. Pietraszek'.