

dr hab. Beata Grobelna, prof. UG

Gdańsk, 27.07.2020 r.

## Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anety Pietraszek

zatytułowanej:

**„Bioaktywny układ haloizyt-fosfataza alkaliczna jako składnik rusztowań hydrożelowych do leczenia ubytków kostnych”**

Opracowana na zlecenie Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Nauki chemiczne  
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Anety Pietraszek pt. „**Bioaktywny układ haloizyt-fosfataza alkaliczna jako składnik rusztowań hydrożelowych do leczenia ubytków kostnych**” została zrealizowana w Zespole Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów Zakładu Chemii Fizycznej i Elektrochemii Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod kierunkiem dr hab. Anny Karewicz.

Tematyka poruszana w ramach niniejszej pracy wpisuje się w nurt zagadnień interdyscyplinarnych stanowiących udane połączenie badań zarówno z poznawczego jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Poszukiwanie nowych funkcjonalnych materiałów, wykorzystywanych jako porowate rusztowania hydrożelowe w odbudowie tkanki kostnej, uzasadniają w pełni podjęcie badań prowadzonych przez Autorkę dysertacji. Ze względu na podobieństwo hydrożelowych rusztowań tkankowych do tkanek miękkich stanowią one grupę biomateriałów o bardzo dobrej biogodności, a to pozwala zmniejszyć stany zapalne oraz odczyny alergiczne w procesie naprawy ubytków kostnych. Ponadto domieszkowanie hydrożeli innymi materiałami np. nanoglinką przyczynia się do uzyskania lepszych właściwości mechanicznych, strukturalnych i biologicznych otrzymanych bioaktywnych rusztowań. Natomiast wprowadzenie do porowatych rusztowań hydrożelowych nie tylko naturalnego minerału z grupy glinokrzemianów w formie nanorurek, ale również substancji bioaktywnej w postaci enzymu fosfatazy alkalicznej zwiększa możliwości aplikacyjne opracowanych rusztowań, a to dodatkowo zwiększa atrakcyjność podjętego tematu badawczego. Rozwiązanie problemu badawczego podjętego przez Doktorantkę, szeroki zakres badań oraz

wyzwania jakie stawia nauka o materiałach wymagały nie tylko rozległej wiedzy z zakresu chemii, ale również znajomości wielu zróżnicowanych metod badawczych charakterystycznych dla hydrożeli, obejmujących następujące techniki: spektroskopię, mikroskopię elektronową, analizę termiczną, czy też dyfraktometrię rentgenowską. Ponadto efektem końcowym realizacji badań mogą być nowe materiały przydatne do otrzymywania rusztowań przeznaczonych do regeneracji tkanki kostnej.

Praca doktorska mgr Anety Pietraszek została napisana w języku polskim, w układzie typowym dla prac badawczo-naukowych. Tytuł przedłożonej rozprawy doktorskiej został poprawnie zdefiniowany i jest zgodny z przedstawionymi w pracy wynikami badań.

Recenzowana rozprawa doktorska obejmuje w sumie 159 stron i została zilustrowana 46 rysunkami oraz zawiera 17 tabel. Dysertacja zawiera wszystkie wymagane elementy: streszczenie w języku polskim oraz angielskim; wykaz stosowanych skrótów; wprowadzenie założenia i cele pracy – hipoteza badawcza; przegląd literaturowy; część eksperymentalną (składającą się z trzech odrębnych części zawierających opisy procedur badawczych, wyniki i ich dyskusję oraz podsumowanie oddzielnie dla każdej części) oraz całkowite podsumowanie rozprawy doktorskiej. Całość pracy wieńczy spis literatury, który obejmuje 175 aktualnych publikacji oraz monografii, ściśle powiązanych z badaną tematyką. Odniesienia do publikacji źródłowych znajdują się także w części eksperymentalnej rozprawy doktorskiej. Integralną część rozprawy doktorskiej stanowią spis rysunków i tabel oraz wykaz dorobku naukowego Doktorantki. W tym miejscu należy wspomnieć, że praca została napisana starannie i przejrzyście, a jej szczególną zaletą jest czytelna szata graficzna. Język, którego używa Autorka w dysertacji, wskazuje na jej wiedzę w zakresie prowadzonych badań, a co za tym idzie na dużą dojrzałość naukową. Drobne błędy edytorskie oraz żargonowe określenia nie mają wpływu na moją pozytywną ocenę recenzowanej pracy.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska rozpoczyna się streszczeniem pracy w języku polskim i angielskim, by następnie przejść do krótkiego dwustronicowego rozdziału zatytułowanego „*Wprowadzenie, założenia i cele pracy – hipoteza badawcza*”, który kieruje czytelnika ku najważniejszemu aspektowi pracy, ale w mojej ocenie jest częściowo powtórzeniem informacji zawartych w streszczeniu. Nie mam większych zastrzeżeń do tego rozdziału, ale trochę zabrakło mi wyeksponowania celu pracy, może z wypunktowaniem zadań badawczych, które zostały wykonane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej.

Kolejnym rozdziałem jest „*Część literaturowa*”, zajmująca 30 stron, która została napisana dość przejrzyście, a wybrane zagadnienia są ściśle związane z tematyką badań zaprezentowanych w części eksperymentalnej. Sposób zaprezentowania oraz wybór materiałów źródłowych jest precyzyjny oraz trafny. W pierwszym rozdziale tej części rozprawy doktorskiej Autorka przedstawiła podstawowe informacje

dotyczące rusztowań do naprawy tkanki kostnej z podziałem na rodzaj użytego materiału (metale, ceramika, polimery, kompozyty polimerowe). Jest to opracowanie syntetyczne, ale zawiera wszystkie najważniejsze informacje dotyczące tych materiałów. W rozdziale drugim Doktorantka opisała haloizyt, jego budowę i właściwości fizykochemiczne, zastosowanie pod kątem dostarczania leków oraz jako składnik rusztowań kostnych. Część trzecia przeglądu literaturowego zawiera najważniejsze informacje dotyczące fosfatazy alkalicznej z uwzględnieniem jej roli w procesie biomineralizacji kości oraz zastosowania jako składnika zwiększającego wytrzymałość mechaniczną rusztowań hydrożelowych. Ten fragment poparty jest licznymi wynikami badań głównie dotyczących procesu biomineralizacji w obecności egzogennego ALP, do których odnosi się Autorka dysertacji. Ostatni rozdział części literaturowej dotyczy szybko rozwijającej się i bardzo aktualnej technologii generatywnej potocznie zwanej drukiem 3D w inżynierii tkankowej. Doktorantka w tej części przedstawiła kilka przykładów wykorzystania tej techniki, nie mam zastrzeżeń co do poprawności merytorycznej, czuję tylko pewien niedosyt opisu otrzymywania i zastosowania materiałów o morfologii rdzeń-powłoka, które są obiecującymi nośnikami kontrolowanego uwalniania związków bioaktywnych.

Na kolejnych stronach rozprawy doktorskiej Autorka przedstawiła część eksperymentalną, podzieloną na trzy składowe, z których każda zawierała następujące sekcje: stosowane odczynniki, opis aparatury, metod i procedur badawczych, wyniki i dyskusję oraz podsumowanie. Opisy stosowanych odczynników oraz omówienie zastosowanych technik pomiarowych nie odbiegają swą zawartością od zwyczajowo oczekiwanych opisów zarówno wykorzystywanej aparatury jak i warunków pomiarów, czy też procedur badawczych. W pierwszej części zatytułowanej „*Charakterystyka fizykochemiczna układu ALP-HAL*” Autorka przedstawiła wyniki badań dotyczących otrzymywania oraz właściwości nowego bioaktywnego komponenta hydrożelowych wypełnień kości opartych na chitozanie, zawierającego nanorurki haloizytu z immobilizowanym enzymem fosfatazą alkaliczną. Doktorantka w uporządkowany sposób począwszy od przedstawienia dwóch metod immobilizacji ALP w nanorurkach haloizytu rozpoczęła prezentację uzyskanych wyników. W rezultacie przeprowadzonych badań okazało się, że aktywność enzymu immobilizowanego Metodą 2 była 4,5 razy większa niż aktywność ALP immobilizowanego Metodą 1. W związku z tym dla kompozytu otrzymanego Metodą 1 Autorka wyznaczyła optymalny stosunek ALP:HAL na podstawie wyznaczonych efektywności immobilizacji oraz efektywności załadowania ALP w HAL, który wyniósł 1:2. Następnie stosując różnorodne techniki badawcze takie jak: mikroskopia SEM, TEM, mikroskopia konfokalna, spektroskopia ATR-FTIR, analiza XPS oraz badania porowatości otrzymanego kompozytu potwierdziła immobilizację ALP w nanorurkach haloizytu. Pozytywne wyniki immobilizacji stanowiły punkt wyjścia do dalszych badań. Doktorantka zbadała aktywność enzymu immobilizowanego w nanorurkach HAL w różnym zakresie pH oraz w różnych temperaturach inkubacji. Wyniki porównała z

danymi uzyskanymi dla czystego enzymu. Przedstawione przez Autorkę wyniki jednoznacznie wskazują na unikalne działanie ochronne i stabilizujące nanorurek haloizytu, powodując utrzymywanie wysokiej aktywności enzymu w szerokim zakresie pH oraz w podwyższonej temperaturze. W ostatniej części tego rozdziału Doktorantka przedstawiła badania dotyczące indukowania procesu biomineralizacji przez otrzymany komponent ALP-HAL. W celu określenia składu minerału wytworzonego na powierzchni ALP-HAL wykonała analizę EDS próbek przed mineralizacją oraz po tygodniowej mineralizacji, ponadto aby zweryfikować wyniki EDS wykonała również analizę XRD. Dodatkowo otrzymane produkty biomineralizacji zostały zobrazowane przy użyciu mikroskopii SEM.

Przechodząc do drugiego rozdziału części eksperymentalnej zatytułowanego „*Bioaktywne rusztowania hydrożelowe z ALP-HAL do naprawy ubytków kostnych*” chciałabym podkreślić, że bogaty materiał doświadczalny zaprezentowany w I części pozwolił Doktorantce na badania użycia opracowanego układu jako składnika hydrożelowych rusztowań do naprawy ubytków kostnych. Doktorantka bazując na doświadczeniu Zespołu Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów w opracowaniu materiałów hydrożelowych, do badań oprócz układu jednoskładnikowego opartego na chitozanie, wybrała układ dwuskładnikowy kolagenowo-chitozanowy, tak aby stworzyć środowisko bardziej kompatybilne dla wzrostu i różnicowania komórek. Po otrzymaniu obu typów hydrożeli z bioaktywnym układem ALP-HAL Doktorantka przeprowadziła dogłębną charakterystykę fizykochemiczną, począwszy od badania procesu pęcznienia, porowatości przez pomiary kąta zwilżenia, aż po pomiary modułu sprężystości. Wyniki jednoznacznie wskazują, że dodatek kompozytu ALP-HAL zwiększa porowatość oraz poprawia właściwości mechaniczne, a badany układ charakteryzuje się kątem zwilżania właściwym do adhezji komórek. Natomiast analizując wprowadzenie drugiego aktywnego składnika kolagenu stwierdziła, że tego typu rusztowania hydrożelowe degradują powoli i stymulują proces biomineralizacji, dzięki czemu możliwy jest proces proliferacji.

W ostatnim rozdziale części eksperymentalnej Doktorantka przedstawiła efekty pracy badań zrealizowanych podczas stażu w Centrum Badań Translacyjnych Kości, Stawów i Tkanek Miękkich w Niemczech. Jakkolwiek są to na razie wstępne próby druku 3D hybrydowych materiałów opracowanych i otrzymanych przez Doktorantkę w ramach realizacji niniejszej pracy, a uzyskanie pasty o pożądanych właściwościach wymagało kolejnych modyfikacji, udało się uzyskać pierwsze prototypy. Najlepiej widać to na rysunkach 44, 45 i 46, przedstawiających wydrukowane obiekty hydrożelowe i nanokompozytowe. Iskierką nadziei w dalszych badaniach jest obserwacja, że dodatek nanoglinki poprawia jakość drukowania oraz właściwości mechaniczne otrzymanego materiału i stwarza możliwość uzyskania rusztowań do hodowli komórkowych techniką drukowania 3D.

Rozprawę doktorską zamyka liczący 2 strony rozdział „Podsumowanie rozprawy doktorskiej”. Jest to opis największych osiągnięć, uzyskanych podczas realizacji pracy doktorskiej. W mojej ocenie częściowo niektóre z informacji zostały przedstawione już pod koniec każdego z trzech rozdziałów stanowiących część eksperymentalną, a zabrakło zwięzłego i syntetycznego zestawienia największych osiągnięć, uzyskanych podczas realizacji dysertacji.

W mojej ocenie do największych osiągnięć podczas realizacji pracy należy:

1. Opracowanie metody immobilizacji enzymu fosfatazy alkalicznej w nanorurkach haloizytu.
2. Otrzymanie i scharakteryzowanie bioaktywnych rusztowań nanokompozytowych opartych na polimerach naturalnych modyfikowanych układem ALP-HAL.
3. Wstępne opracowanie receptury pasty drukarskiej do druku 3D rusztowań do hodowli komórkowych na bazie wcześniej opracowanych przez Doktorantkę materiałów hybrydowych.

Do obowiązków recenzenta należy również wskazanie pewnych niezgodności, uwag czy też pytań, które nasunęły się podczas lektury pracy doktorskiej:

1. Na stronie 30 Doktorantka pisze „... prezentują szereg ligandów i peptydów, które ułatwiają adhezję komórek...” – czy mogłaby Pani wymienić jakie to są ligandy i peptydy?
2. Na stronie 37 – Doktorantka używa niepoprawną nazwę dla ditlenku krzemu (jako tlenek krzemu).
3. Na stronie 73 przedstawiona jest informacja „W metodzie tej enzym ALP odrywa grupę fosforanową z fosforanu 4-4-nitrofenylu...”- po pierwsze drobna literówka w nazwie związku, ale moja uwaga dotyczy samej reakcji, a mianowicie prośba o zaprezentowanie mechanizmu reakcji.
4. Na stronie 85 czytając poniższy opis dotyczący zastosowania mikroskopii konfokalnej do potwierdzenia obecności ALP w HAL, można troszeczkę się pogubić. Na początku Doktorantka pisze, że „...co uniemożliwiło jednoznaczne potwierdzenie, że białko znajduje się w środku HAL...” , natomiast w ostatnim zdaniu jest napisane „...uzyskany obraz potwierdził, jednoznacznie, że białko zostało immobilizowane w nośniku HAL” – poproszę o komentarz.
5. Na stronie 92 brakuje informacji, w jakim czasie po biomineralizacji zostało zarejestrowane zdjęcie przy użyciu mikroskopii SEM (Rys. 29B).
6. Kończąc rozprawę doktorską Autorka przedstawiła perspektywy badawcze. Jak widać, jest wiele różnych możliwości modyfikacji opracowanego układu. Jednak nasunęło mi się pytanie – Czy ten materiał może być również wykorzystany jako wypełniacz stosowany w medycynie estetycznej?

Miarą naukową wartości przedstawionej mi do oceny dysertacji jest to, że rezultaty badań naukowych przeprowadzonych w ramach tej pracy zostały już częściowo opublikowane. Pani mgr Aneta Pietraszek jest współautorką 2 prac oryginalnych (opublikowane wyniki rozprawy doktorskiej), jednej monografii oraz pracy przeglądowej. Ponadto Doktorantka prezentowała swoje osiągnięcia na konferencjach krajowych (6) oraz międzynarodowych (16).

W mojej ocenie struktura pracy oraz prezentowane treści są poprawne i nie budzą zastrzeżeń. Cele jakie postawiła przed sobą Doktorantka zostały zrealizowane, a uzyskane wyniki pomiarowe prawidłowo zinterpretowane, a to świadczy o samodzielności naukowej mgr Anety Pietraszek. Wymienione w trakcie recenzji uwagi nie umniejszają wartości rozprawy doktorskiej i nie mają wpływu na moją pozytywną ocenę dysertacji, a nieliczne drobne uchybienia świadczą jedynie o dokładnym zapoznaniu się recenzenta z treścią rozprawy doktorskiej. Wartością dodaną prowadzonych badań jest ich duża potencjalna wartość aplikacyjna.

Podsumowując moją ocenę rozprawy doktorskiej uważam, że zarówno jej tematyka jak i poruszane w niej zagadnienia są ważne zarówno z poznawczego jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Stanowią oryginalne podejście do problemu badawczego i w pełni potwierdzają wiedzę i umiejętności Doktorantki do samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Zatem stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy o stopniach naukowych i tytule i naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (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. 1669), a także zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Pozwala mi to wystąpić z wnioskiem do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Anety Pietraszek do dalszych etapów przewodu doktorskiego i do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

B. Grobelna

dr hab. Beata Grobelna, prof. UG