



dr hab. Magdalena Fitta, prof. IFJ PAN
Instytut Fizyki Jądrowej PAN
ul. Radzikowskiego 152
31-342 Kraków
Email: Magdalena.Fitta@ifj.edu.pl

Kraków, 21.07.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Adrianny Małgorzaty Gilarskiej pt. „Bioaktywne nanokompozyty dla potrzeb inżynierii tkankowej”

Rozprawa doktorska pt. „Bioaktywne nanokompozyty dla potrzeb inżynierii tkankowej”, której autorką jest mgr Adrianna Gilarska, została zrealizowana na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo- Hutniczej oraz na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod opieką prof. dr hab. Czesława Kapusty, prof. dr hab. Marii Nowakowskiej oraz dr hab. Joanny Lewandowskiej-Łańcuckiej. Recenzowana praca ma charakter interdyscyplinarny- obejmuje zakres nauk fizycznych oraz chemicznych. Celem badań przedstawionych w rozprawie było zaprojektowanie, otrzymanie oraz dokładne scharakteryzowanie nowych bioaktywnych nanokompozytów o potencjalnym zastosowaniu jako rusztowania do hodowli komórkowych dla potrzeb inżynierii tkankowej. Tematyka prac podjętych przez Doktorantkę wpisuje się zatem w bardzo ważny i intensywnie rozwijany trend badań.

Przedłożona do recenzji rozprawa została przygotowana w formie monografii liczącej 243 strony. Praca zawiera kolejno „Streszczenie”, „Streszczenie w języku angielskim”, „Wykaz skrótów”, „Spis rysunków”, „Spis tabel”, „Wstęp”, a następnie dwie zasadnicze części, czyli część literaturową zatytułowaną jako „Wprowadzenie” oraz „Część eksperymentalną” przedstawiającą wyniki doświadczalne uzyskane w ramach realizacji niniejszej pracy. Całość rozprawy wieńczy „Podsumowanie rozprawy i wnioski”, opis dorobku naukowego Doktorantki oraz licząca 293 pozycje bibliografia. Jest to układ pracy bardziej typowy dla nauk chemicznych niż fizycznych. Brakuje tu bowiem jednego rozdziału dotyczącego opisu wszystkich technik i metod eksperymentalnych wykorzystywanych podczas realizacji rozprawy, natomiast krótki opis aparatury wykorzystywanej do charakteryzacji otrzymanych materiałów znajduje się w każdym podrozdziale poświęconym kolejnym otrzymanym materiałom, dlatego też pewne informacje są tu wielokrotnie powtarzane.

Problematyka badań podjętych przez Doktorantkę dotyczy organicznie- nieorganicznych materiałów hybrydowych do zastosowań biomedycznych. Część organiczną stanowią biopolimerowe matryce hydrożelowe, natomiast komponenty nieorganiczne to cząstki krzemionki lub nanocząstki magnetyczne. Wszystkie przedstawione nanokompozyty

poddano dokładnej charakteryzacji, a szczególną uwagę poświęcono takim własnościom jak bioaktywność, stabilność w czasie, zdolność do pęcznienia i degradacji.

W krótkim „Wstępie” Autorka w jasny i zwięzły sposób przedstawia cel i zakres swojej pracy. Opisane są tu dokładne cele prowadzonych badań oraz sformułowana hipoteza badawcza, w której Pani Gilarska postuluje, że „możliwe jest zaprojektowanie i otrzymanie bioaktywnych nanokompozytów przydatnych jako rusztowania do hodowli komórek dla potrzeb inżynierii tkankowej”.

We „Wprowadzeniu” Doktorantka przedstawiła aktualny stan wiedzy dotyczący przedmiotu rozprawy. W pierwszej kolejności omówione zostały zagadnienia związane z inżynierią tkankową, macierzami zewnątrzkomórkowymi oraz rusztowaniami komórkowymi. Następnie analizie poddano aktualny stan badań związany z hydrożelami, w szczególności tymi opartymi na trzech biopolimerach: kolagenie, chitozanie oraz kwasie hialuronowym. Dużo uwagi Autorka poświęciła na opis nanokompozytów, gdzie szczegółowo omówiła rolę cząstek krzemionki czy nanocząstek tlenku żelaza jako komponentów nieorganicznych tych nanokompozytów. W tej części omówione są również własności alendronianu- leku przeciwosteoporotycznego, systemy jego dostarczania oraz opisano zjawisko superparamagnetyzmu. Ostatni podrozdział tej części pracy poświęcony jest technice otrzymywania rusztowań komórkowych poprzez druk 3D.

Najważniejszą częścią pracy jest niewątpliwie „Część Eksperymentalna” składająca się z czterech głównych części, gdzie każda z nich zawiera wprowadzenie, opis zastosowanych materiałów i technik eksperymentalnych, wyniki badań oraz dyskusję i podsumowanie. W części pierwszej opisano syntezę oraz własności fizykochemiczne i biologiczne nanokompozytów na bazie hydrożelowych matryc oraz cząstek krzemionki. Szczególną uwagę Autorka poświęciła na optymalizację składu matrycy hydrożelowej, analizując zależność udziału chitozanu, kwasu hialuronowego, kolagenu oraz genipiny na własności reologiczne, degradację enzymatyczną czy adhezję komórek. Przeprowadzone badania dowiodły, że otrzymane hydrożele mają potencjał sieciowania *in situ* w 37 °C i mogą być aplikowane w formie wstrzykiwanej. W kolejnym kroku do wybranej matrycy hydrożelowej dodano cząstki krzemionki sfunkcjonalizowane grupami aminowymi. W rezultacie otrzymano stabilny bioaktywny materiał hybrydowy, dla którego eksperymenty przeprowadzone w warunkach symulujących ludzkie osocze wykazały pojawienie się fazy mineralnej. W części drugiej opisano proces syntezy oraz własności biologiczne i fizykochemiczne nanokompozytów opartych na matrycach hydrożelowych oraz cząstkach krzemionkowo- apatytowych z przyłączonym lekiem przeciwosteoporotycznym. Tym razem do wytworzenia matryc hydrożelowych zastosowano sfunkcjonalizowany grupami aminowymi kwas hialuronowy, co sprawiło, że mógł być on chemicznie sieciowany genipiną razem z kolagenem i chitozaniem. Otrzymane materiały hybrydowe wykazywały umiarkowaną hydrofilowość powierzchni, zdolność do pęcznienia, przedłużony czas degradacji oraz pożądane własności mechaniczne. Na podstawie badań biomineralizacji, w warunkach zbliżonych do ludzkiego osocza, zaobserwowano przyspieszony proces tworzenia się nowej fazy mineralnej zbliżonej do struktury apatytu kostnego. Wyniki uzyskane w tej części rozprawy pokazały, że otrzymane nanokompozyty mogą być wprowadzane do ubytku kostnego, a jednocześnie stanowić system do kontrolowanego i miejscowego dostarczania alendronianu. Jest to ważny krok w zwiększeniu efektywności

leczenia osteoporozy. W części III opisano hydrożele magnetyczne, w których matrycę stanowiła mieszanina kolagenu i chitozanu sieciowanego genipiną, a komponentem nieorganicznym były superparamagnetyczne nanaocząstki tlenku żelaza. Obecność nanocząstek w matrycy hydrożelowej została potwierdzona poprzez badania spektroskopii mössbauerowskiej, magnetometrii oraz przy zastosowaniu skaningowej transmisyjnej mikroskopii elektronowej. W ramach przeprowadzonych prac wykazano, że umieszczenie nanocząstek magnetycznych w matrycy hydrożelowej powoduje obniżenie temperatury blokowania, co wiąże się z lepszą separacją nanocząstek i zmniejszenia ich wzajemnego oddziaływania. Dodatkowo stwierdzono, że zarówno obecność nanocząstek magnetycznych jak i przyłożenie zewnętrznego pola magnetycznego o natężeniu 500 Oe ma wpływ na proliferację komórek (po 7 dniach zaobserwowano redukcję liczby komórek lub zahamowanie ich wzrostu). W ostatniej części pracy poświęconej badaniom własnym opisano wytwarzanie oraz analizę własności biologicznych i fizykochemicznych rusztowań 3D wytwarzanych metodą druku 3D przy zastosowaniu techniki ekstruzji. Atramenty do drukowania 3D wytwarzano na bazie wszystkich wcześniej opisanych biopolimerów: kolagenu, chitozanu, kwasu hialuronowego i kwasu hialuronowego sfunkcjonalizowanego grupami aminowymi. Metyloceluloza została użyta jako czynnik poprawiający lepkość, zaś do stabilizacji rusztowań wykorzystano dwuetapowe sieciowanie genipiną oraz TTP. W rezultacie jako najstabilniejsze uznano rusztowanie otrzymane jako mieszanina kolagenu i chitozanu. Wykazano również, że dodanie komponentu nieorganicznego, nie wpływa negatywnie na efektywne drukowanie trójwymiarowych struktur.

Po zapoznaniu się z rozprawą mam kilka uwag i pytań sformułowanych poniżej:

- Z punktu widzenia własności magnetycznych, kluczowym parametrem charakteryzującym SPIONy jest średnica tych nanocząstek. W pracy pojawia się tylko zdawkowa informacja, że „magnetyczne rdzenie SPION-CCh charakteryzowały się średnicą około 15 nm”. Czy wyznaczono rozkład wielkości tych rdzeni? Czy proces syntezy tych nanocząstek był powtarzalny?

- Na podstawie pokazanych widm mössbauerowskich nie zostały wyznaczone parametry struktury nadsubtelnej (pole nadsubtelne, oddziaływanie kwadrupolowe). Brakuje też pomiaru powyżej temperatury blokowania.

- Jaką długość fali zastosowano w pomiarach zmiany transmitancji w czasie?

- W przypadku wyznaczenia zależności ZFC-FC dla nanocząstek SPION-CCh pomiar wykonano w zbyt wąskim przedziale temperaturowym- żeby precyzyjnie wyznaczyć temperaturę blokowania należałoby wykonać pomiar do 370-400K.

-Autorka wspomina o relaksacyjnym charakterze materiałów superparamagnetycznych, ale niestety nie podjęła się analizy tych własności. Czy planowane są dalsze badania hydrożeli magnetycznych np. w kierunku wyznaczenia czasów relaksacji czy energii aktywacji tych układów?

Praca zredagowana jest starannie i mimo znacznej objętości nie zawiera wielu błędów czy niejasności. Niemniej jednak Autorka nie ustrzegła się kilku nieścisłości:

-str. 57, „Jak wspomniano wcześniej, SMF oraz PEMF są najczęściej badanymi typami pól magnetycznych.”

- str. 71, w paragrafie „Materiały” w zdaniu brakuje orzeczenia,

-str. 87, „Do plastikowej zlewki wprowadzono 700 ml wody dejonizowanej, umieszczono ją w łaźni wodnej, a całość ustawiono na mieszadle magnetycznym.”; „sprawdzono temperaturę, aby wynosiła 36,5 °C”; „Roztwór przelano z plastikowej zlewki do kolby i uzupełniono wodą dejonizowaną do kreski”; „Materiały hybrydowe do hodowli komórkowej otrzymano w płytkach 24-dółkowych (po 3 powtórzenia dla każdego rodzaju)...”

-na większości mikrofotografii SEM albo brakuje skali, albo jest bardzo słabo widoczna,

Powyższe uwagi krytyczne, nie mają istotnego wpływu na moją wysoką ocenę pracy.

Na szczególną uwagę zasługuje bardzo bogaty dorobek naukowy Pani mgr Gilarskiej. Jest ona współautorką 8 publikacji naukowych o bardzo wysokich współczynnikach wpływu (3.623-9.229) oraz 4 zgłoszeń patentowych. Doktorantka brała udział w realizacji 3 projektów naukowych, przy czym była kierownikiem jednego z nich (Etiuda NCN). Ponadto Pani mgr Gilarska odbyła dwa staże w uznanych ośrodkach badawczych: Drezdeńskim Uniwersytecie Technicznym oraz Uniwersytecie w Saragossie. Daje to mocne świadectwo, że Doktorantka jest dobrą kandydatką do dalszej pracy naukowej.

Plan badań i metodyka prowadzonych przez Doktorantkę prac nie budzą żadnych zastrzeżeń. Pani mgr Gilarska wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Przedmiot rozprawy dotyczy niesłychanie ważnych i aktualnych zagadnień, a wyniki uzyskane przez Doktorantkę są oryginalne i mają istotne znaczenie poznawcze. Warta podkreślenia jest liczba zastosowanych metod badań biologicznych i fizykochemicznych, co przyczyniło się do dokładnego scharakteryzowania uzyskanych nanokompozytów.

Reasumując, praca doktorska Pani mgr Adrianny Gilarskiej, jest wnikliwym studium poświęconym badaniom nanokompozytów dla potrzeb inżynierii tkankowej, a uzyskane materiały mogą znaleźć zastosowanie w regeneracji tkanki kostnej. Praca doktorska mgr Pani Gilarskiej ma charakter oryginalnej pracy naukowej i zawiera wymagane w rozprawach doktorskich elementy nowości naukowej, co zostało dodatkowo udokumentowane artykułami opublikowanymi w czasopiśmie z listy JRC. Z całym przekonaniem stwierdzam, że prezentowana rozprawa doktorska spełnia wymagania ustawowe dla rozpraw doktorskich i dlatego wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Fizycznych Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Magdalena Fitta

dr hab. Magdalena Fitta, prof. IFJ PAN