

Prof. dr hab. inż. Wojciech Świąszkowski

Warszawa, 30.07.2022 r.

Wydział Inżynierii Materiałowej

Politechnika Warszawska

## **RECENZJA**

rozprawy doktorskiej mgr Adrianny Małgorzaty Gilarskiej  
pt.: **“Bioaktywne nanokompozyty dla potrzeb inżynierii tkankowej”**  
opracowana na zlecenie Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne, Akademii  
Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie

### **1. Tematyka rozprawy**

Recenzowana rozprawa doktorska dotyczy aktualnej i ważnej tematyki badawczej związanej z poszukiwaniem nowych rozwiązań materiałowych wspomagających procesy naprawcze uszkodzonych tkanek i narządów. Koncentruje się na nowych rozwiązaniach do regeneracji tkanki kostnej, aby odpowiedzieć na rosnące zapotrzebowanie na metody leczenia ubytków kostnych. Wpisuje się w nowe trendy naukowe dotyczące inżynierii tkankowej (IT), interdyscyplinarnej dziedziny, wykorzystującej podstawy nauk inżynierijno-technicznych, nauk biologicznych, chemicznych oraz nauk medycznych w celu pozyskania biologicznych zamienników, które przywracają, utrzymują lub poprawiają funkcjonowanie tkanki lub narządu. W IT z tkanki pacjenta pobiera się komórki, najczęściej komórki macierzyste. Następnie izoluje się je, namnaża, ewentualnie różnicuje i zasiedla się nimi specjalny porowaty

implant (rusztowanie) pełniący rolę nośnika komórek oraz rusztowania tkankowego. Dodatkowo rusztowanie wzbogaca się w czynniki wzrostu wspomagające odbudowę tkanki. Tak przygotowane rusztowanie zwane również produktem inżynierii tkankowej wszczepia się do miejsca uszkodzonego. Z czasem w miejscu ubytku odbudowuje się brakująca tkanka, a rusztowanie rozpuszcza się.

Jednym z najważniejszych czynników warunkujących odbudowę tkanki jest bioaktywne i biofunkcjonalne trójwymiarowe podłoże komórkowe. Pełni ono rolę zastępczej macierzy pozakomórkowej, która jest nośnikiem komórek a jednocześnie tworzy dla nich środowisko do rozwoju i tworzenia nowej tkanki. Do jego wytwarzania można użyć biomateriałów syntetycznych lub pochodzenia naturalnego, które sprzyjają właściwej adhezji, proliferacji i różnicowaniu komórek, a po spełnieniu swojej roli ulegną biodegradacji. W przypadku regeneracji tkanki kostnej, na podłoża do hodowli komórek bada się polimery naturalne tj. kolagen, żelatynę, chitozan, kwas hialuronowy oraz syntetyczne tj. PCL, PLGA, PLLA, PHBV, etc. Rozważa się również zastosowanie bioceramiki apatytowej lub materiałów metalicznych. Najnowsze trendy wskazują zalety stosowania połączenia polimerów z bioceramiką tworząc kompozyty. Kształt i strukturę rusztowania można nadać stosując typowe metody inżynierskie stosowane do wytwarzania konstrukcji porowatych. Najpopularniejsze z nich to pręcznie rozwijające się techniki przyrostowe (druku 3D), w tym biodrukowanie, lub technika elektroprzędzenia. W ostatnich latach podejmowane są również próby łączenia obu metod w celu wytwarzania rusztowań hybrydowych.

Doktorantka w swojej pracy koncentruje się nad opracowaniem nowych trójwymiarowych rusztowań do odtworzenia ubytków tkanki kostnej. Do ich wytworzenia wykorzystuje słusznie zarówno polimery naturalne jak i ceramikę, syntezując z nich nanokompozyty. Wybrane polimery naturalne: kolagen, chitozan, czy kwas hialuronowy używa do syntezy materiałów hydrożelowych. Materiały i metodę sieciowania opracowuje w taki sposób, aby zapewnić możliwość wstrzykiwania materiału do ubytku, gdzie ostatecznie nastąpi jego usieciowanie. Jest to interesujące podejście, również opisywane w literaturze przedmiotu, które zakłada, że wraz z degradacją bioaktywnego materiału nastąpi odbudowa tkanki kostnej.

Zastosowanie wstrzykiwalnych hydrożeli umożliwi również lokalne podawanie leków bezpośrednio do miejsca leczenia. Doktorantka zamierza wykorzystać tę cechę do dostarczenia znanego leku wspomagającego leczenie osteoporozy - alendronianu sodu. W celu lepszej kontroli szybkości uwalniania, Pani Magister proponuje zgodnie z

literaturą użycie jako nośnika leku krzemionki z wytworzoną na niej warstwą apatytową. Zmodyfikowana krzemionka z lekiem umieszczona została w osnowie hydrożelowej.

Praca jest wielowątkowa. Kandydatka do stopnia doktora zajęła się w doktoracie także materiałami o właściwościach magnetycznych, podkreślając rolę pola magnetycznego w odbudowie tkanki kostnej. Tworzy nanokompozyty o wspomnianej wcześniej osnowie hydrożelowej z dodatkiem nanocząstek magnetycznych na bazie tlenku żelaza i bada ich wpływ na zachowanie komórek.

Oprócz form wstrzykiwalnych rusztowania tkankowe mają postać 3D porowatych struktur, wytwarzanych typowymi metodami inżynierskimi stosowanymi do wytwarzania materiałów porowatych. Najpopularniejsze z nich to prężnie rozwijające się techniki przyrostowe (druku 3D), w tym biodrukowanie. Ta ostatnia metoda pozwala na wytworzenie w jednym procesie zasiedlonego komórkami konstruktów, gotowego do dalszej hodowli tkanek *in vitro* lub *in vivo*. Doktorantka będąc na stażu w grupie Profesora Gelinsky'ego zapoznaje się z technikami druku 3D i biodruku oraz sprawdza możliwości wytworzenia tymi metodami rusztowań kostnych z materiałów kompozytowych wcześniej opracowanych. Tym samym wzbogaca merytorycznie prace o ten wątek badawczy.

W świetle tych rozważań można stwierdzić, że tematyka recenzowanej pracy doktorskiej jest obszerna a zarazem aktualna. Zaś wielowątkowe prace badawcze zaplanowane i zrealizowane przez Panią Doktorantkę bardzo dobrze wpisują się w nowe trendy naukowe związane z rozwojem biomateriałów i rusztowań dla leczenia uszkodzeń tkanki kostnej.

## **2. Struktura, cel i zakres pracy**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani Adrianny Gilarskiej jest napisana w języku polskim. Jest obszerna i liczy aż 243 stron. We *Wstępie* Doktorantka formułuje główny cel pracy, który brzmi następująco: *„zaprojektowanie, otrzymanie i scharakteryzowanie bioaktywnych nanokompozytów, potencjalnie przydatnych jako rusztowania (skafoldy) do hodowli komórkowych dla potrzeb inżynierii tkankowej, w*

szczegółności do regeneracji tkanki kostnej.” W dużym skrócie opisuje także zakres pracy oraz formułuje hipotezę, że „możliwym jest zaprojektowanie i otrzymywanie bioaktywnych nanokompozytów przydatnych jako rusztowanie do hodowli komórkowych dla potrzeb inżynierii tkankowej kości.” Hipoteza ta wydaje się być zbyt ogólna.

Rozprawa składa się właściwie z 2 głównych części: *Wprowadzenie* oraz *Część Eksperymentalna*, które są podzielone na rozdziały i podrozdziały. We *Wprowadzaniu* Autorka wprowadza czytelnika w tematykę pracy na podstawie przeprowadzonego przeglądu na podstawie 228 pozycji literaturowych. Licząca 42 stron część pracy stanowi poprawny opis stanu zagadania w tematyce rozprawy. Znajdują się w nim informacje na temat inżynierii tkankowej, macierzy pozakomórkowej, rusztowań tkankowych. Doktorantka opisuje także wybrane w pracy materiały hydrożelowe oraz nanokompozyty. Kończy *Wprowadzenie* omówieniem metod druku 3D. Do słabych stron tej części pracy należy zaliczyć dość skromny opis opublikowanych rozwiązań materiałowych stosowanych w inżynierii tkanki kostnej. Brakuje wyraźnego podkreślenia jakie są wady obecnie stosowanych rozwiązań i przede wszystkim jakich rozwiązań brakuje. Mogłoby to stanowić dobre uzasadnienie (motywację) podjęcia zaplanowanych w pracy badań.

Badania własne Doktorantka opisuje w *Części Eksperymentalnej*. Jest to najobszerniejsza część rozprawy, która liczy 139 stron. Została podzielona na 4 główne rozdziały: „*Nanokompozyty oparte na hydrożelowej matrycy i cząstkach krzemionki*”, „*Wielofunkcyjne nanokompozyty przydatne w leczeniu osteoporozy*”, „*Nanokompozyty oparte na hydrożelowej matrycy i nanocząstkach magnetycznych*”, oraz „*Nanokompozyty otrzymane metodą druku 3D*”. Już na podstawie tego podziału można podkreślić wielowątkowość recenzowanej rozprawy.

Cztery rozdziały podzielone są na podrozdziały. Każdy z nich zawiera krótkie wprowadzenie, a następnie podrozdziały z opisem materiałów i metod badawczych, wyników wraz z dyskusją oraz podsumowaniem. Na uwagę zasługuje fakt, że większość prezentowanych wyników została już opublikowana w uznanych czasopismach naukowych, o czym we wprowadzeniu wspomina Doktorantka, i co potwierdzają przytoczone przez Autorkę publikacje.

Pierwszy rozdział dotyczy kompozytów o hydrożelowej osnowie i wypełnieniu w postaci cząstkach krzemionki. Czerpiąc doświadczenie z prac realizowanych w

zespołach badawczych Prof. Marii Nowakowskiej oraz Prof. Joanny Lewandowskiej-Łańcuckiej, Promoterek recenzowanej rozprawy, Doktorantka opracowała materiał osnowy, w którego skład weszły powszechnie stosowane w inżynierii tkankowej kolagen, chitozan i kwas hialuronowy. Badała wpływ składu mieszaniny polimerowej CoChHA oraz stężenia środka sieciującego - genipiny, na wybrane właściwości fizyczne i chemiczne oraz biologiczne otrzymanych hydrożeli. Wykazano, że wyższe stężenia genipiny i dłuższe czasy sieciowania powodowały wzrost właściwości mechanicznych oraz spowolnienie procesu degradacji. Do wytworzenia materiałów kompozytowych użyto najbardziej obiecującego wg Doktorantki hydrożelu, CoChHA 4/1 (50:40:10), sieciowanego najwyższym stężeniem genipiny (20mM). Jako wypełniacz zastosowano sfunkcjonalizowane grupami aminowymi submikronowe cząstki krzemionkowe. Cząstki krzemionkowe znane są ze swoich właściwości osteogennych. Funkcjonalizacja krzemionki miała za zadanie umożliwić kowalencyjne przyłączenie cząstek do osnowy hydrożelowej. Po scharakteryzowaniu morfologii, rozmiaru, porowatości i potencjału zeta wypełniacza wprowadzono go do roztworu biopolimerów w 3 różnych stężeniach. Tak przygotowane układy poddano sieciowaniu genipiną. Otrzymane materiały kompozytowe wykazały spadek stopnia pęcznienia wraz ze wzrostem zawartości ceramiki. Uzyskano niewielkie różnice w module zachowawczym w badanych próbkach. Badania degradacji w PBS wskazały na największy ubytek masy po pierwszym dniu degradacji. Znacznie szybciej przebiegała utrata masy kompozytów w obecności enzymu - kolagenazy. W obu przypadkach degradacja kompozytów z najmniejszym udziałem krzemionki przebiegała najszybciej. Właściwości bioaktywne otrzymanych materiałów hybrydowych zbadano prowadząc siedmiodniową inkubację w roztworze SBF. Dodatek krzemionki stymulował tworzenie się warstwy apatytowej na hydrożelach. Co potwierdzało pewną bioaktywność tych materiałów. Ze względu na przyszłe aplikacje istotna była ocena żywotności/prolifracji komórek oraz ich aktywności ALP. Do badań użyto często stosowanych w takich badaniach komórek osteoblastopodobnych - MG-63. Liczba komórek wrastała w kolejnych dniach hodowli (1,3 i 7). W porównaniu z kontrolą dla badanych materiałów uzyskano większą aktywność fosfatazy alkalicznej. Jej podwyższony poziom towarzyszy wczesnym etapom różnicowania w kierunku fenotypu komórek kościotwórczych.

Drugi rozdział dotyczy wytwarzania i badania kompozytów, które mogłyby być przydatne w leczeniu osteoporozy. Podobnie jak w rozdziale pierwszym Doktorantka

rozpoczęła prace od opracowania materiału osnowy. W tym przypadku zaproponowała użycie w układzie z kolagenem i chitozanem zmodyfikowanego lizyną kwasu hialuronowego. Modyfikacja kwasu doprowadziła do utworzenia w jego strukturze grup aminowych, które pozwoliły na jego sieciowanie genipiną. W wyniku sieciowania układów o różnych udziałach biopolimerów (takich jak w rozdziale pierwszym) wytworzono porowate materiały hydrożelowe o dużej porowatości rzędu 85-95%, co jest korzystne dla rusztowań tkankowych. Materiały z największą zawartością HA<sub>mod</sub> charakteryzowały się największym stopniem pęcznienia. Zmierzone kąty zwilżania mieściły się w zakresie 65-91 stopni, co wskazuje na hydrofilowy charakter powierzchni hydrożeli. Na podstawie przeprowadzonych badań reologicznych stwierdzono, że moduł zachowawczy materiału hydrożelowego wzrastał wraz ze wzrostem czasu sieciowania i stężenia genipiny. W badaniach degradacyjnych, już po 4 godzinach inkubacji hydrożeli w medium z dodatkiem kolagenazy widoczna była znaczna utrata ich masy. Materiały z układu ColChHA<sub>mod</sub>2/3 (50:20:30) ulegały całkowitej degradacji po 144 godzinach. Zbadano również właściwości biologiczne in vitro wytworzonych hydrożeli. Test Alamar Blue wykazał, że liczba komórek MG-63 pozytywnie wzrastała wraz z ich czasem hodowli. Aktywność fosfatazy alkalicznej również wrosła z czasem hodowli i była znacząco wyższa dla hydrożeli w porównaniu z kontrolą. W badaniach mikrobiologicznych zauważono, że hydrożele wykazywały właściwości antybakteryjne w stosunku do *S. aureus* i *E. Coli*, które słabły wraz ze zmniejszaniem zawartości chitozanu w materiale.

W kolejnym etapie, otrzymane hydrożel wzbogacono w znany lek przeciwosteoporotyczny - alendronian w celu nadania im właściwości leczniczych. Lek ten osadzono na cząstkach krzemionki dekorowanej apatytem. Jest to interesujące rozwiązanie, które oprócz właściwości przeciwosteoporotycznych będzie wspomagać odbudowę tkanki kostnej.

Opisane w rozdziale pierwszym cząstki SiO<sub>2</sub> sfunkcjonalizowane grupami aminowymi podane zostały inkubacji w roztworze SBF, w celu wytworzenia na ich powierzchni związków apatytowych. Na tak przygotowanych cząstkach osadzono alendronian. Otrzymany proszek (SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN), zawieszono w trzech różnych stężeniach w zolu z układu ColChHA<sub>mod</sub>2/3 (50:20:30) i usieciowano genipiną otrzymując materiały kompozytowe. Przeprowadzono szereg właściwie zaplanowanych badań w celu scharakteryzowania właściwości zarówno nośników leku jak i bioaktywnych materiałów kompozytowych. Badania nośników z zastosowaniem spektroskopii

fotoelektronów XPS oraz termogravimetrii TG potwierdziły obecność i efektywność przyłączenia alendronianu. Obserwacje mikroskopowe SEM materiałów kompozytowych potwierdziły występowanie w ich strukturze, najczęściej w postaci mniejszych lub większych aglomeratów, SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN. Otrzymane materiały posiadały pożądane właściwości fizyczne i chemiczne. Były to materiały hydrofilowe, które wykazywały zdolność do pęcznienia malejącą wraz ze wzrostem zawartości napełniacza. Alendronian uwalniał się z hydrożelu na zasadzie dyfuzji, co umożliwiło jego przedłużone dostarczanie do miejsca leczenia. Bioaktywny dodatek w kompozycie sprzyjał tworzeniu się warstwy apatytu na materiale inkubowanym w roztworze SBF. Potwierdzono również wzrost aktywności komórek osteoblastopodobnych MG-63 oraz osłabienie aktywności komórek osteoklastopodobnych (J774A.1). Przeprowadzone badania in vivo poprzez wszczepienie hydrożeli pod skórę myszom, nie wykazały toksyczności opracowanych materiałów. Zaobserwowano jedynie miejscowe stany zapalne. Materiały kompozytowe ulegały szybkiej degradacji. Na uwagę zasługuje fakt, że opracowany materiał przebadany w warunkach in vitro oraz in vivo objęty został krajowym i międzynarodowym zgłoszeniem patentowym.

W rozdziale trzecim pracy Doktorantka opisuje wyniki badań dotyczące nanokompozytów hydrożelowych o właściwościach magnetycznych. Umieściła w osnowie hydrożelowej chitozanolagenowej o dwóch różnych stosunkach objętościowych tych polimerów wytworzone nanocząstki superparamagnetyczne - opłaszczone kationową pochodną chitozanu (SPION-CCh), co umożliwiło ich połączenie z osnową podczas sieciowania genipiną. Strukturę oraz proces sieciowania otrzymanych materiałów analizowano z zastosowaniem NMR. Badania wykazały tworzenie się usieciowanej struktury hydrożeli o bimodalnym rozkładzie wielkości porów. Pomiar natężenia światła przechodzącego przez próbki potwierdziły dobrą dyspersję cząstek w osnowie oraz stabilność wytworzonych kompozytów. Pomiar magnetometryczny wykazały, że hydrożele wzbogacone w SPION-CCh posiadają właściwości magnetyczne. Okazało się, że skład osnowy wpływa na ułożenie superparamagnetycznych nanocząstek w kompozycie, co może zmieniać również ich oddziaływanie magnetyczne. Podobnie jak wcześniej omawiane kompozyty hydrożele magnetyczne ulegały znacznemu pęcznieniu w PBS. Obecność cząstek SPION-CCh w hydrożelach nie wpłynęła znacząco na stopień pęcznienia. Degradacja materiałów była zależna zarówno od składu osnowy (stosunku kolagenu do chitozanu) jak i

dotatku nanocząstek. Podobnie było w przypadku zmierzonego modułu zachowawczego. Moduł ten małał wraz z dodatkiem kolagenu i SPION-CCh. Hodowla MG-63 na powierzchni wytworzonych materiałów nie wykazała negatywnego wpływu dodatków na proliferację komórek. Proliferacja MG-63 była zaburzona w 7 dniu dla materiałów z nanocząstkami oraz pod wpływem przyłożonego pola magnetycznego. Efekt ten powinien być zweryfikowany, co właściwie interpretuje Doktorantka.

W rozdział IV pracy doktorskiej Pani Adrianny Gilarskiej opisuje badania zrealizowane przez Doktorantkę w ramach stażu w TU Drezden, w grupie Profesora Michaela Gelinsky'ego. Dotyczyły one wytwarzania metodą druku 3D rusztowań kostnych z wykorzystaniem biopolimerów oraz materiałów nieorganicznych, które zostały opracowane we wcześniejszych etapach doktoratu. Na wstępie zoptymalizowano skład atramentów - lepkich past w celu nadania im właściwości wymaganych w procesie kontrolowanego wyłaczania. W celu zwiększenia lepkości Doktorantka dodała do mieszanin biopolimerowych metylocelulozę. Ostatecznie do druku rusztowań z samych hydrożeli użyto następujących układów: ColChHA 4/1 MC9, ColChHAMod 2/3 MC9 oraz ColCh 25:75 MC9. Badania stabilności rusztowań w 3 różnych mediach PBS, DMEM i HPLM wykazały, że jedynie konstrukcje wytworzone z ColCh 25:75 MC9 były stabilne we wszystkich mediach inkubacyjnych. Dlatego do dalszych badań zastosowano ten rodzaj osnowy. Z jej udziałem opracowano atramenty do druku zawierające różne cząstki: SiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>-Ap, oraz SPION-CCh. Atramenty wykazywały pożądaną właściwość typową dla cieczy rozrzedzanych ścinaniem - ich lepkość malała wraz ze wzrostem szybkości ścinania. Po procesie druku można było wnioskować, że opracowane tusze umożliwiły wytworzenie zakładanych geometrii rusztowań. Ponadto dodatki nieorganiczne wpływały korzystnie na stabilność wydruków podczas inkubacji w symulowanym sztucznym osoczu (HPLM). Wstępne badania biologiczne z użyciem komórek macierzystych wykazały, że opracowane atramenty lepiej nadają się do drukowania rusztowań i ich zasiedlania komórkami niż do biodrukowania komórek. Zaproponowane w pracy biotusze wymagają dalszej optymalizacji.

W ostatnim rozdziale rozprawy Pani Magister w sposób syntetyczny podsumowuje uzyskane wyniki, wymienia najważniejsze według niej osiągnięcia pracy. Nie nakreśla jednak przyszłych kierunków badań w tematyce pracy.



Na szczególną uwagę i podkreślenie zasługuje przytoczony w pracy dorobek naukowy Doktorantki. Wymienia 8 publikacji w wysokopunktowanych czasopismach, które powstały w ramach realizacji pracy doktorskiej (6), magisterskiej (1) i inżynierskiej (1). Jest też współautorką kilku zgłoszeń patentowych. Wyniki badań prezentowała na licznych konferencjach międzynarodowych (19) i krajowych (12). Była kierownikiem projektu NCN ETIUDA 8 oraz brała udział w realizacji innych 2 grantów. Przytoczony dorobek Doktorantki świadczy o Jej wyróżniającej aktywności naukowej.

Rozprawa zakończona jest bogatą bibliografią. Spis zawiera 293 pozycji literaturowych, aktualnych i zgodnych z tematyką pracy. Są wśród nich książki oraz artykuły naukowe.

Praca doktorska jest przygotowany z dużą starannością. Jej układ, użyty język, słownictwo i terminologia są poprawne. Jest wzbogacona licznymi ilustracjami, wykresami i tabelami co podnosi czytelność i jakość przygotowanego opracowania. Do uwag krytycznych dotyczących strony edytorskiej pracy można zliczyć używanie przez Dyplomantka słów „matryca” zamiast „osnowa”, „ilość komórek”, zamiast „liczba komórek”. Można znaleźć też drobne błędy językowe. Duża część rysunków prezentujących wyniki z SEM jest mało czytelna.

### **3. Ocena merytoryczna i uwagi krytyczne**

Tematyka rozprawy jest aktualna i ważna, zarówno z punktu widzenia zdobywania nowej wiedzy w dyscyplinie jak i rozwoju biomateriałów oraz inżynierii tkankowej. Znakomicie wpisuje się w nowoczesne kierunki badań w obszarze bioaktywnych materiałów dla potrzeb medycyny regeneracyjnej kości.

Na podkreślenie zasługuje obszerny oraz interdyscyplinarny zakres badań zrealizowanych w pracy, który obejmował wytwarzanie typowych układów kompozytowych polimer-ceramika, wzbogacanie ich w leki czy też cząstki magnetyczne, aż po ocenę możliwości druku 3D opracowanych nanokompozytów. Do ich wykonania Doktorantka wykorzystwała szereg interesujących metod syntezy materiałów hydrożelowych, cząstek ceramicznych lub magnetycznych oraz nanokompozytów polimerowych. Właściwie dobrała i poprawnie zastosowała liczne

metody badawcze niezbędne do charakteryzacji wytworzonych materiałów pod kątem ich struktury oraz właściwości chemicznych i fizycznych. Wielowątkowość podjętej tematyki wymagała od Doktorantki wykorzystania metod i urządzeń badawczych tj. SEM, STEM, EDS, AFM, FTIR, XRD, XPS, NMR, pomiary potencjału zeta, porowatości i kąta zwilżania, DLS, BET, badania właściwości reologicznych, pęcznienia, degradacji, biomineralizacji, oraz badania właściwości magnetycznych. Przeprowadziła również z dużą starannością badania biologiczne in vitro oraz in vivo opracowanych materiałów. Wykonała badania żywotności i morfologii komórek, aktywności fosfatazy alkalicznej, analizy hematologiczne krwi, histologię, oraz badania właściwości antybakteryjnych.

Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki należy zaliczyć opracowanie nowych bioaktywnych materiałów kompozytowych o osnowie hydrożelowej i napełniaczach ceramicznych. Osnowa składała się z biopolimerów tj. kolagen, chitozan oraz kwas hialuronowy, sieciowanych genipiną. Z szeroko zakrojonych badań okazało się, że optymalnym składem była mieszanina Col:Ch:HA=50:40:10. To w niej zawieszono cząstki krzemionki sfunkcjonalizowanej grupami aminowymi w celu uzyskania stabilnej struktury kompozytowej. Zastosowanie naturalnych hydrożeli oraz aktywnej krzemionki wpłynęło na korzystne właściwości biologiczne nanokompozytów.

Na szczególną uwagę zasługują także rezultaty prac badawczych dotyczące wzbogacenia materiału kompozytowego w lek przeciwosteoporetyczny. Do cząstek krzemionkowo-apatytowych przyłączono alendronian sodu i umieszczono je w osnowie ColChHAmo. Wstępne badania wskazały na działanie terapeutyczne tak przygotowanych materiałów uwalniających lek.

Warte podkreślenia są również osiągnięcia Doktorantki związane z wytwarzaniem kompozytów o właściwościach magnetycznych. Hydrożele z superparamagnetycznymi cząstkami tlenku żelaza miały wpływ na zachowanie komórek bez i w obecności pola magnetycznego.

Należy też podkreślić wartość poznawczą prac dotyczących przystosowania opracowanych materiałów do druku 3D. Stosując metodę ekstruzji wytworzono ze zmodyfikowanych kompozytów trójwymiarowe struktury, które mogą pełnić rolę rusztowań.

Podsumowując, cel pracy został osiągnięty - zaprojektowano, otrzymano i scharakteryzowano bioaktywne nanokompozyty, potencjalnie przydatnych jako rusztowania (skafoldy) do hodowli komórkowych dla potrzeb inżynierii tkankowej, w

szczegółności do regeneracji tkanki kostnej. Tym samym wykazano ogólnie sformułowaną hipotezę, że „możliwym jest zaprojektowanie i otrzymywanie bioaktywnych nanokompozytów przydatnych jako rusztowanie do hodowli komórkowych dla potrzeb inżynierii tkankowej kości.”

Mimo wysokiej jakości przeprowadzonych prac badawczych, czytając rozprawę nasuwają się pewne uwagi i pytania zarówno do przyjętej metodyki jak i uzyskanych wyników:

1. Doktorantka użyła do sieciowania hydrożeli genipinę. W wielu doniesieniach literaturowych wykazano, że duże stężenia tej substancji mogą być toksyczne. Dalsze badania genotoksyczności byłyby wskazane w celu sprawdzenia skutków działania stosowanego środka sieciującego.
2. Nasuwa się także pytanie jaki uzyskano stopień usieciowania hydrożeli. Sieciowanie prowadzono w różnych czasach. Jaki czas był najwłaściwszy i dlaczego?
3. Badania degradacji enzymatycznej przeprowadzono z udziałem kolagenazy. Wiadomo jednak, że w przypadku chitozanu właściwszym enzymem jest lizozym.
4. Badania pęcznienia prowadzono w 24 godziny. Dlaczego w takim okresie? Czy Doktorantka sprawdziła, że wydłużenie czasu ponad 24h nie zmienia stopnia pęcznienia hydrożeli?
5. Charakteryzując materiały kompozytowe zwykle podaje się udział % napełniaczy. Tego zabrakło w pracy, co utrudnia porównanie kompozytów otrzymanych w pracy. Brakuje również wymiarów wytworzonych próbek do dalszych badaniach. Korzystne byłoby również pokazanie wyników EDS, np. w postaci map rozmieszczenia obecnych w materiale pierwiastków.
6. Badania mikroskopowe dotyczyły charakteryzacji powierzchni. Trudno z takich obrazów wnioskować o rozmieszczeniu napełniacza w całej osnowie polimerowej. Równomierne rozmieszczenie cząstek w całej objętości osnowy, bez obecności aglomeratów, jest kluczową cechą materiałów kompozytowych.
7. W ocenie żywotności komórek nie podano liczby komórek i wyników ich proliferacji na próbkach kontrolnych. Jest to konieczne w celu określenia potencjału użytych w badaniach komórek.

8. Dość dyskusyjna jest zastosowana metoda badania adhezji komórek do powierzchni wytworzonych materiałów. Nie jest jasne jak z tak niewyraźnych mikrofotografii SEM obliczono powierzchnie zajmowaną przez komórki.
9. Oprócz badań reologicznych, ze względu na przewidziane zastosowanie w regeneracji tkanki kostnej, wytworzone materiały powinny zostać zbadane z użyciem testów mechanicznych umożliwiających wyznaczenie ich sztywności i wytrzymałości. Badania mechaniczne przeprowadzono jedynie dla przygotowywanych do druku 3D. Powstaje jednak pytanie jak wyznaczono moduł Younga wydrukowanych rusztowań i czy test jednoosiowego ściskania jest najwłaściwszą metodą wyznaczenia tego modułu? (str. 200-201).
10. Porównując wyniki badań właściwości podobnych materiałów opisywanych w różnych rozdziałach pracy tj. pęcznienie, moduł zachowawczy, kąt zwilżania można zauważyć nieuzasadnione różnice. Skąd one wynikają?
11. Doktorantka podsumowuje, że otrzymane materiały posiadają obiecujące właściwości na potrzeby inżynierii tkankowej kości. Dlaczego nie przeprowadzono innych badań biologicznych potwierdzających przydatność opracowanych materiałów w regeneracji tkanki kostnej.

Nieliczne, jak na tak obszerne i wartościowe opracowanie naukowe, uwagi krytycznych nie obniżają mojej wysokiej oceny recenzowanej pracy doktorskiej. Opiniowana rozprawa doktorska posiada wiele aspektów poznawczych i stanowi oryginalny wkład Autorki w rozwój inżynierii biomateriałów oraz inżynierii tkankowej. W szczególności zawiera oryginalne wyniki badań dotyczące bioaktywnych materiałów kompozytowych na podłoża do hodowli tkanek w medycynie regeneracyjnej.

#### **4. Wniosek końcowy**

Biorąc pod uwagę powyższe rozważania, uważam, że rozprawa mgr inż. Adrianny Gilarskiej pod tytułem: „**Bioaktywne nanokompozyty dla potrzeb inżynierii tkankowej**”, spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku „o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki”. Wnioskuje więc do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne

Akademii Górniczo-Hutniczej o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie Doktorantki do publicznej obrony.

Ponadto, biorąc pod uwagę obszerny zakres badań naukowych, ich wysoki poziom merytoryczny i duże znaczenie dla rozwoju dyscypliny naukowej, jak również udział w realizacji projektów badawczych, oraz wyróżniającą aktywność naukową i publikacyjną mgr inż. Adrianny Gilarskiej, które moim zdaniem znacznie przekraczają zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim, wnioskuję do Rady Naukowej o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej.

Wojciech Świąszkowski

