



Zachodniopomorski
Uniwersytet
Technologiczny
w Szczecinie



Katedra
Inżynierii Polimerów
i Biomateriałów

Al. Piastów 45, 71-311 Szczecin

prof. dr hab. inż. Mirosława El Fray

tel: (+48) 91 499 48 28

fax: (+48) 91 499 40 98

Email: mirfray@zut.edu.pl

Ocena pracy doktorskiej Pani **mgr inż. Anny Krokos**

pt.: **„Polimerowo-ceramiczne biomateriały do regeneracji tkanki kostnej”**

zrealizowanej pod kierunkiem promotora,
prof. dr hab. inż. Andrzeja Trochimczuka
oraz promotora pomocniczego,
dr inż. Małgorzaty Gazińskiej

w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych i w dyscyplinie nauki chemiczne

Recenzja została opracowana na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej z dnia 12 maja 2023.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska powstała w oparciu o wyniki badań opublikowanych w 2 publikacjach i zawartych w trzech zgłoszeniach patentowych. Rozprawa zasadniczo nie odbiega od klasycznego układu z podziałem na omówienie aktualnego stanu wiedzy, w oparciu o który został zdefiniowany cel i hipotezy badawcze. W części eksperymentalnej (badawczej) Autorka omówiła materiały i metody badawcze, a następnie przedstawiła uzyskane wyniki i przeprowadziła dyskusję. Na końcu opracowania liczącego 171 stron, Doktorantka przedstawiła wnioski oraz 198 pozycji literaturowych. W pracy można znaleźć również informacje na temat dorobku naukowego Autorki. Doktorantka przedstawiła również zakres merytoryczny udziału współautorów oraz własnego w przygotowanie publikacji i zgłoszeń patentowych. Niniejsza recenzja zawiera ocenę merytoryczną i naukową pracy doktorskiej w odniesieniu do aktualności i nowości podejmowanych zagadnień badawczych, poprawności doboru metod badawczych oraz technik eksperymentalnych.

Aktualność tematu pracy

Tkanka kostna, która stanowi ok. 30% masy ciała ludzkiego, jest ważnym elementem konstrukcyjnym ludzkiego organizmu, który niestety w wyniku chorób lub urazów wymaga częstych interwencji chirurgicznych, a ostatecznie substytutów w postaci implantów. I choć klasyczne implanty wykonane z metali lub nie ulegających degradacji materiałów polimerowych i ceramicznych są rutynowo stosowane w rekonstrukcji tkanki kostnej, to produkty inżynierii tkankowej na podstawie biodegradowalnych polimerów syntetycznych lub pochodzenia naturalnego oraz komórek własnych pacjenta stanowią co raz częściej dogodną alternatywę, zwłaszcza jeśli stymulują procesy osteointegracji po implantacji. Doktorantka na podstawie dokonanego przeglądu literatury wskazała, że największy potencjał w sprostaniu tym wymaganiom mogą spełnić kompozyty polimerowo-ceramiczne (przez analogię do naturalnej tkanki kostnej) na podstawie poli(l-laktydu) (PLLA), jako materiału ulegającego resorpcji w środowisku płynów fizjologicznych oraz modyfikowanych fosforanów wapnia, głównie hydroksyapatytu (HAP) i bioszkle. W obszarze technik wytwarzania porowatych skafoldów, Autorka zwróciła uwagę na druk 3D jako wszechstronną metodę do wytwarzania struktur przestrzennych, pozwalającą na dużą swobodę doboru odpowiedniej techniki i kontrolę architektury porów i uzyskiwania personalizowanych implantów. Doktorantka stwierdziła również, że kluczowym czynnikiem decydującym o biomineralizacji implantów jest ich osteointegracja, którą można osiągnąć poprzez biofunkcjonalizację powierzchni materiałów ceramicznych za pomocą aminokwasów stanowiących monomeryczne jednostki struktur białkowych. Autorka stwierdziła, że szczególnie interesujące są białka adhezyjne, takie jak L-lizyna i 3,4-dihydroksy-1-fenyloalanina (DOPA).

W oparciu o przeprowadzoną analizę stanu wiedzy zawartą na ponad 40 stronach, Doktorantka zaplanowała i wykonała badania, których głównym celem było opracowanie dwufazowych kompozytów polimerowo-ceramicznych zawierających zmodyfikowane powierzchniowo cząstki hydroksyapatytu i bioszkle oraz poli(L-laktydu)(PLLA), w tym mikrosfer PLLA. Autorka wytworzyła klasyczne folie kompozytowe metodą wylewania z rozpuszczalnika oraz przygotowała pasty ceramiczno-polimerowe, które następnie wykorzystwała do wytwarzania struktur porowatych techniką plotowania (drukowania) 3D. Materiały zostały poddane gruntownym badaniom właściwości mechanicznych, profilu uwalniania jonów i degradacji hydrolitycznej *in vitro*. Podejmowane w pracy zagadnienia są nowatorskie, a tematyka niezwykle aktualna.

Analiza doboru technik eksperymentalnych i metodyk badawczych

Kluczowym elementem prac badawczych zrealizowanych przez Doktorantkę było przeprowadzenie procesu modyfikacji powierzchni hydroksyapatytu i bioszkle, a następnie wykonanie kompozytów polimerowo-ceramicznych. Na podstawie przeprowadzonego przeglądu literaturowego, Doktorantka wytypowała L-lizynę oraz polidopaminę jako prekursory adhezyjnych białek, które powinny sprzyjać

biomineralizacji wytwarzanych z ich udziałem skafoldów. W celu osiągnięcia efektywnej modyfikacji cząstek ceramicznych Doktorantka zastosowała metodę szczepienia poli(glikolu etylenowego)(PEG) zakończonego grupami karboksylowymi lub aminowymi i odpowiedniego środka sprzęgającego oraz metodę silanizacji w odniesieniu do bioszkiełka. Doktorantka opracowała dwa rodzaje kompozytów: w postaci folii na podstawie PLLA i modyfikowanych cząstek ceramicznych w stosunku wagowym 9:1 oraz past wytworzonych techniką emulsyjną z odparowaniem rozpuszczalnika z mikrosfer PLLA i hydroksyapatytu o zawartości 10% wag. Pasty zostały wykorzystane do druku 3D. Do badania wytworzonych materiałów Doktorantka zastosowała szereg nowoczesnych metod badawczych służących do charakterystyki strukturalnej, termicznej i biologicznej wypełniaczy oraz kompozytów, w tym spektroskopię w podczerwieni, skaningową mikroskopię elektronową, skaningową kalorymetrię różnicową (DSC), analizę termogravimetryczną (TGA), testy degradacji hydrolitycznej *in vitro*, testy cytotoksyczności i inne. Doktorantka przeprowadziła również badania uwalniania jonów wapnia i fosforu dla rusztowań wykonanych techniką plotowania 3D oraz oceniła właściwości mechaniczne skafoldów. Doktorantka przeprowadziła szereg badań, których celem było wyjaśnienie wpływu funkcjonalizacji cząstek ceramicznych na właściwości fizykochemiczne i biologiczne matrycy, do której zostały wprowadzone, czyli do PLLA. Doktorantka zbadała również wpływ mikrosfer PLLA na właściwości fizykochemiczne i biologiczne cementu fosforanowo-wapniowego.

Doktorantka w sposób umiejętny dobrała techniki badawcze, co wskazuje na fakt bardzo dobrego poruszania się w temacie rozprawy. Połączenie technik analitycznych typowych dla nauk chemicznych z charakterystyką biologiczną opracowanych układów wskazuje na interdyscyplinarny charakter pracy doktorskiej Pani Krokos.

Podsumowując, należy stwierdzić, że zastosowane techniki eksperymentalne i metody badawcze zostały dobrane w sposób trafny i jednocześnie odzwierciedlają bardzo bogaty, eksperymentatorski charakter pracy doktorskiej.

Elementy nowości w pracy

Doktorantka zajęła się w swoich badaniach modyfikacją powierzchniową materiałów ceramicznych za pomocą L-lizyny i polidopaminy wykorzystując metodę sprzęgania z poli(glikolem etylenowym)(PEG) o różnych masach cząsteczkowych i z różnymi grupami funkcyjnymi (karboksylową, aminową i tiolową). Wykorzystała również reakcje silanizacji i sprzęgania w celu modyfikacji powierzchni cząstek bioszkiełka. Zmodyfikowane cząstki ceramiczne posłużyły jako efektywny wypełniacz kompozytów polimerowo-ceramicznych na podstawie PLLA. Zarówno sposób modyfikacji cząstek ceramicznych jak i kompozyty polimerowo-ceramiczne oraz sposób ich wytwarzania stanowią przedmiot trzech zgłoszeń patentowych (P427351 z 2018 r., P432700 z 2020 r. oraz P440261 z 2022 r.) co bezsprzecznie potwierdza nowatorstwo podjętej tematyki. Doktorantka zbadała stabilność termiczną kompozytów zawierających zmodyfikowany HAP wskazując na poprawę ich stabilności termicznej oraz aktywne zarodkowanie krystalizacji. Nowością w recenzowanej pracy jest wykazanie efektu wspierania mineralizacji układów zawierających zmodyfikowane powierzchniowo cząstki ceramiczne, zarówno wylewanych filmów jak i rusztowań wytworzonych z past na

podstawie mikrosfer PLLA i cząstek ceramicznych. Doktorantka wykazała również biogodność materiałów w kontakcie z komórkami mysich fibroblastów L929, ludzkich osteoblastów hFOB 1.19 oraz doskonałą adhezję i proliferację komórek macierzystych hTERT-MSC. Nowatorski charakter przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników potwierdzają, oprócz zgłoszeń patentowych, dwie publikacje w czasopismach *Polimery (2020)* i *Int J Mol Sci (2020)*. Warto zaznaczyć, że szereg przeprowadzonych badań zrealizowano w ramach projektu o akronimie GlassPoPep finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu Techmatstrateg, projektu Opus finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki oraz w ramach stażu Doktorantki na Politechnice Drezdeńskiej finansowanego przez DAAD.

Uwagi dyskusyjne

Praca dotyczy modyfikacji powierzchniowej cząstek ceramicznych i ich wykorzystania w kompozytach polimerowo-ceramicznych o poprawionym efekcie biomineralizacji. Doktorantka zajęła się dogłębną analizą wpływu metod modyfikacji hydroksyapatytu i bioszkiełka L-lizyną i polidopaminą na budowę chemiczną i właściwości zmodyfikowanych cząstek. Wskazała na możliwość wytworzenia z ich udziałem kompozytów polimerowo-ceramicznych o poprawionej zdolności do biomineralizacji, podatności na degradację hydrolityczną i uwalnianie jonów oraz na doskonałe właściwości biologiczne w testach *in vitro*. Dyskusja uzyskanych wyników badań przeprowadzona osobno dla kompozytów wylewanych z roztworu oraz past do plotowania 3D na podstawie mikrosfer PLLA i nanocząstek ceramicznych jest dobrze zredagowana, a wnioski są sformułowane w sposób poprawny.

Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów, m.in.: na str. 23 Autorka przytacza nazwy podstawowych monomerów do syntezy poli(L-laktydu), jednak spośród trzech wymienionych monomerów tylko dwa zostały przedstawione na rys. 5. Doktorantka używa dosłownie przetłumaczonych określeń typu: „wiskoelastyczny” zamiast *lepkosprężysty*, „konstrukt” zamiast *struktura (obiekt)*, itp. Autorka używa sformułowania „biokompatybilne materiały”, co nie jest cechą samą w sobie tylko określeniem dotyczącym zawsze układu materiał-gość. Proszę zatem o precyzyjne przedstawienie definicji biokompatybilności, np. w oparciu o pracę prof. Davida F. Williamsa „*There is no such thing as a biocompatible material*”.

Uwaga ma charakter dyskusyjny i nie umniejsza licznym walorom poznawczym przedstawionym w dysertacji.

Podsumowując stwierdzam, że nie wnoszę zasadniczych uwag do interpretacji wyników i sposobu przeprowadzenia badań.

Wnioski końcowe

Doktorantka zrealizowała bardzo obszerny program badań eksperymentalnych, uzyskując interesujące wyniki o niepodważalnych znamionach nowości naukowej. Praca wnosi cenny wkład w aspekty poznawcze dotyczące zagadnień z obszaru nauk chemicznych, zwłaszcza metody modyfikacji powierzchniowej cząstek ceramicznych i ich wykorzystania do wytwarzania kompozytów polimerowo-ceramicznych techniką

wylewania z roztworu i drukowania (plotowania) 3D z wykorzystaniem past przygotowanych w oparciu o mikrosfery polimerowe i proszki ceramiczne. Doktorantka wykazała, że opracowany sposób modyfikacji cząstek ceramicznych sprzyja biomineralizacji wytworzonych struktur przestrzennych, a otrzymane materiały kompozytowe wykazują dobre właściwości biologiczne w testach komórkowych *in vitro*.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że Kandydatka do stopnia doktora jest współautorem 6 artykułów opublikowanych w indeksowanych czasopismach, choć pierwszym Autorem jest tylko w jednej pracy. W dorobku Doktorantki znajduje się również 6 zgłoszeń patentowych oraz osiem wystąpień/posterów konferencyjnych. Doktorantka odbyła również trzy krótkoterminowe staże: dwa w Niemczech (Politechnika w Dreźnie) i jeden na Uniwersytecie Łódzkim.

Biorąc pod uwagę osiągnięte wyniki, stwierdzam iż przedłożona do recenzji praca doktorska mgr inż. Anny Krokos spełnia warunki przewidziane ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (art. 192 ust. 2, Dz.U. poz. 1668, z późn. zm.) oraz art. 180 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. poz. 1669, z późn. zm.).

Dlatego wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Krokos do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony. Ponadto, biorąc pod uwagę, że (i) recenzowana praca dostarcza nowych i wartościowych informacji na temat metod chemicznej modyfikacji nanocząstek ceramicznych i ich wykorzystania w wytwarzaniu kompozytów polimerowo-ceramicznych, (ii) wskazuje na możliwości praktycznego wykorzystania pozyskanej wiedzy przy projektowaniu rusztowań dla inżynierii tkankowej do regeneracji tkanki kostnej, oraz (iii) udowadnia, że Doktorantka ze swobodą wykorzystuje różne narzędzia badawcze stosowane nie tylko w naukach chemicznych, ale i w naukach biologicznych i inżynierii materiałowej, wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mag inż. Anny Krokos.

Szczecin, 18.08.2023 r.