

prof. uczelni, dr hab. inż.
Agnieszka Gadomska-Gajadhur
agnieszka.gajadhur@pw.edu.pl

Katedra Chemii i Technologii Polimerów
ul. Koszykowa 75, 00-662 Warszawa

Warszawa, dn. 28 sierpnia 2023 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr. Pawła Jakuba Piszko

zatytułowanej

„Materiały kompozytowe na bazie poli(sebacynianu gliceryny) do potencjalnego wykorzystania w inżynierii tkankowej kości”.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr. **Pawła Jakuba Piszko** została wykonana w Katedrze Inżynierii i Technologii Polimerów, Wydziału Chemicznego w Politechnice Wrocławskiej. Promotorem rozprawy doktorskiej był prof. PWR, dr hab. inż. Konrad Szustakiewicz. Promotorem pomocniczym była dr Karolina Rudnicka z Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego.

Tematyka przedstawionej rozprawy doktorskiej jest zgodna z moimi zainteresowaniami naukowymi (materiały do regeneracji tkanek i ocena odpowiedzi komórkowej, synteza i badanie właściwości kompozytów polimerowo-ceramicznych, ocena biodegradacji materiałów).

Jednocześnie oświadczam, że nie prowadziłam i nie prowadzę z Doktorantem żadnych badań naukowych oraz, że nie jesteśmy współautorami żadnej pracy naukowej.

Wybór tematyki pracy: Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr. Pawła Piszko wpisuje się w bardzo aktualną tematykę poszukiwania nowych materiałów do wytwarzania wypełnień do tkanki kostnej. Jest to tematyka podejmowana przez wiele zespołów w kraju i na świecie. O jej popularności świadczy bardzo duża liczba artykułów corocznie pojawiających się w literaturze naukowej. Szczególne miejsce w artykułach naukowych w ostatnich latach zajmuje poli(sebacynian gliceryny). Od 2002 roku nieustannie pojawiają się nowe doniesienia naukowe o wykorzystaniu tego materiału na potrzeby medycyny regeneracyjnej. W Polsce aktualnie realizowanych jest kilka projektów badawczych skupiających się na tym materiale. Trwają również prace nad wdrożeniem poli(sebacynianu gliceryny) (PGS) do przemysłu. Wszystkie te stwierdzenia jednoznacznie pokazują, że tematyka doktoratu jest bardzo aktualna i dobrze wpisuje się w obecnie prowadzone badania naukowe w kraju i na świecie.



Cel rozprawy: Głównym celem rozprawy było opracowanie i wytworzenie nowych materiałów mających potencjalne zastosowanie w inżynierii tkanki kostnej. Cel miał być realizowany przez zastosowanie poli(sebacynianu gliceryny) jako matrycy, napełnianej hydroksyapatytem. Opracowane materiały miały pozytywnie wpływać na proces osteogenezy. Drugim celem pracy było zweryfikowanie użyteczności wytworzonych kandydatów na biomateriały pod względem ich właściwości fizykochemicznych i mechanicznych. Doktorant w ramach celu badawczego postawił 2 hipotezy badawcze, które w kolejnych etapach pracy próbował zweryfikować.

Ocena ogólna rozprawy: Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. Pawła Piszko obejmuje ogółem 150 stron maszynopisu komputerowego, zawierającego 52 rysunki, 15 tabel i 214 cytowane źródła literaturowe. Pracę uzupełniają streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów. Do pracy został dołączony dorobek naukowy Doktoranta, który w mojej ocenie jest bardzo dobry jak na ten etap kariery naukowej.

Strona graficzna pracy doktorskiej jest przygotowana bardzo starannie i może być wizytówką Doktoranta. Doktorant wykonał wiele bardzo czytelnych rysunków, które ułatwiają zrozumienie opisów i otrzymanych wyników. Tabele, widma IR oraz NMR są przygotowane bardzo estetycznie oraz czytelnie. Termogramy oraz obrazy z mikroskopów są bardzo dobrej jakości, a ich interpretacja nie stwarza problemów. Jednak na rysunku 6, Doktorant nie ustrzegł się błędów merytorycznych. Wzór, który tam zamieszcza jako sebacynian dimetylu nim nie jest. Doktorant przedstawił wzór diketonu zamiast diestru.

Negatywnym aspektem pracy doktorskiej jest słownictwo, którym posługuje się Doktorant. W pracy mgr Piszko używa niewłaściwego języka naukowego. Występuje bardzo dużo określeń żargonowych i subiektywnych ocen doktoranta nie podpartych argumentami naukowymi, jak np. „atrakcyjne materiały”. Doktorant ma tendencje do nadużywania słów kwiatów, tj. „również, co więcej itp.”, przez co niektóre zdania są bardzo długie i trudne w uchwyceniu myśli przewodniej. Często buduje zdania w niewłaściwy sposób, zmieniając osobę w której pisze lub liczbę pojedynczą na mnogą. Myślę, że Doktorant w tym aspekcie mógł dołożyć więcej staranności podczas przygotowania rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska mgr. Pawła Piszko została przedstawiona w klasycznym układzie, często spotykanym w doktoratach w formie monografii podzielonej na rozdziały z uwzględnieniem wstępu, przeglądu literatury, wypukleniem celów i hipotez rozprawy, omówieniem stosowanych metod i materiałów, opisem otrzymanych wyników wraz z ich



dyskusją oraz wnioskami. Pewną wątpliwość budzi u mnie postawienie hipotez badawczych przed przeglądem literatury. W moim odczuciu hipotezy badawcze powinny wynikać z przeprowadzonego przeglądu literatury, a nie być „narzucone z góry”.

Zawartość przeglądu literaturowego dobrze uzasadnia podejmowane działania opisane w części badawczej przez Doktoranta. Ta część pracy wprowadza czytelnika w zagadnienia badawcze przedstawione w pracy doktorskiej. W kolejnych rozdziałach części literaturowej Doktorant przedstawia syntezę i właściwości PGS, opisuje metody formowania z niego rusztowań komórkowych oraz dwie drogi potencjalnego zastosowania materiałów na bazie PGS. Takie spojrzenie na dostępną literaturę pokazuje dojrzałość naukową Doktoranta i zasługuje na moje uznanie. Aspektem, którego mi w tej części zabrakło jest podsumowanie przeglądu literatury, w którym należało zwrócić uwagę na zagadnienia wymagające dalszych badań. W przeglądzie literatury zabrakło mi także informacji z dotychczas przeprowadzonych badań *in vitro* i *in vivo* materiałów z PGS z dodatkami nieorganicznymi, a takich danych w literaturze nie brakuje.

Przechodząc do kolejnej części pracy poświęconej metodyce badań, na uznanie zasługuje liczba przeprowadzonych analiz i szeroka współpraca wielośrodkowa. Doktorant posłużył się metodami badawczymi stosowanymi w chemii polimerów i w inżynierii materiałowej, tj. skaningowa mikroskopia elektronowa, skaningowa kalorymetria różnicowa, termogravimetria, pomiary kąta zwilżania, spektroskopia w podczerwieni lub magnetycznego rezonansu jądrowego oraz z wiele innych. Dalsze stosowane metody są typowe dla badań komórkowych. Doktorant wykonał testy cytotoksyczności i wyznaczył właściwości osteoindukcyjne oraz ich analizę statystyczną. Przyjęta metodyka badawcza jest prawidłowa i zgodna z prezentowanym w literaturze protokołem badań komórkowych.

Doktorant starał się podejść do tematu swojej rozprawy doktorskiej możliwie kompleksowo i wyczerpująco. W wyniku tego postępowania zgromadził obszerny materiał badawczy, który jest przedmiotem kilku publikacji naukowych. Kompleksowe podejście do przedmiotu badań na tak wczesnym etapie kariery naukowej jest „pułapką”, którą Doktorant sam na siebie zastawił, i niestety w nią wpadł. Wszystkie poruszane aspekty mają charakter bardzo pobieżnego zbadania tematu bez głębszego wnिकnięcia w otrzymane wyniki. W moim odczuciu ciężko jest zaleźć środek ciężkości tego doktoratu, a właściwie stwierdzić, w którym aspekcie Doktorant jest specjalistą? Czy w syntezie polimerów, przetwórstwie czy w badaniach komórkowych?



Ocena merytoryczna rozprawy: Podjęcie tak wielu aspektów badawczych przez Doktoranta, jak już wspomniałam, nie uchroniło go od popełnienia wielu błędów. W części dotyczącej syntezy polimerów Doktorant w całej pracy nie podaje ciężarów cząsteczkowych z syntezowanych przez siebie polimerów, a jest to podstawowy parametr charakteryzujący każdy polimer. Doktorant dysponował widmami NMR mógł więc wyznaczyć przybliżony ciężar cząsteczkowy lub wykonać pomiary GPC lub MALDI. Podobna sytuacja występuje z określeniem zawartości grup końcowych w prepolimerze. Mając zsyntezowany prepolimer PGS, metodami miareczkowymi (LK i LE) można było wyznaczyć zawartość grup końcowych karboksylowych i hydroksylowych co wg mojej wiedzy jest kluczowe w procesie późniejszego sieciowania materiału prowadzącego do wytworzenia skafoldu. Stosowanie równomolowego stosunku monomerów o różnej funkcyjności też nie jest najlepszym wyborem. W przypadku kwasu sebacynowego (F 2) i gliceryny (F 3), grup kwaśnych zawsze będzie w niedomiarze, co może prowadzić do bardzo długiego czasu sieciowania lub braku możliwości sieciowania materiału. Zdecydowanie korzystniej (krótszy czas, niższa temperatura sieciowania) byłoby prowadzić reakcję w równomolowym stosunku grup funkcyjnych obecnych w monomerach. Ważnym aspektem tej reakcji jest również odbieranie produktu małowcząsteczkowego (wody), powstającego w reakcji. W stosowanym przez siebie układzie badawczym Doktorant tego nie robił, a wpływało by to korzystnie na czas reakcji i ciężar cząsteczkowy prepolimeru. W części syntetycznej zabrakło mi także rozważenia reakcji ubocznych mogących wystąpić podczas syntezy, jak odwodnienie gliceryny do toksycznej akroleiny w temperaturze powyżej 150°C. Czy Doktorant nie obserwował toksyczności wobec komórek niektórych zsyntezowanych przez siebie materiałów? Mogło być to spowodowane obecnością właśnie akroleiny.

W części dotyczącej wytwarzania skafoldów Doktorant zastosował dobrze znaną i powszechnie stosowaną metodę sieciowania termicznego z wymywaniem soli. Analizując naturę poli(sebacynianu gliceryny), tzn. występowanie w różnych formach od wosku przez ciecz do elastomeru w zależności od stopnia usieciowania, uważam ten wybór za słuszny. Wybór NaCl jako porofora również był prawidłowy i często spotykany we wcześniejszych pracach naukowych. Jednak stosowanie dioksanu jako rozpuszczalnika z punktu widzenia dalszych badań komórkowych jest wyborem nienajlepszym. Dioksan jest rozpuszczalnikiem toksycznym wobec większości linii komórkowych. Jest też rozpuszczalnikiem trudnym do usunięcia z wyrobu końcowego (wysoka temp. wrzenia). Dlatego też jego ilość w wyrobie końcowym, a szczególnie



w produkcie medycznym powinna być ściśle oznaczona i kontrolowana. Niestety w całej pracy ani razu nie zostało takie oznaczenie wykonane.

Część dotycząca charakterystyki wytworzonych skafoldów jest przygotowana bardzo dobrze. Doktorant sprawnie posługuje się większością zamieszczonych analiz, potrafi też wyciągać właściwe wnioski z otrzymanych wyników. Stosowanie zaawansowanych technik obrazowania skafoldów wymagało od doktoranta nawiązania współpracy z badaczami z innych zespołów naukowych. Współpraca ta pozwoliła na wykonanie pomiarów mikrotomografii rentgenowskiej czy stereoskopowej mikroskopii optycznej. Zamieszczenie tych wyników niewątpliwie podnosi wartość merytoryczną pracy doktorskiej. W aspekcie badania chropowatości powierzchni (rysunek 47) nie potrafiłam zweryfikować wniosków doktoranta dotyczących zmian w powierzchni skafoldu. Mam wrażenie, że na każdym obrazie skala jest inna więc nie można ich porównywać między sobą. W pracy zabrakło mi też definicji chropowatości, która doktorant się posługuje. Proszę o jej przedstawienie podczas obrony.

Na moje uznanie i pochwałę zasługują badania termiczne i mechaniczne zamieszczone w pracy. Opisane i zaprezentowane są wzorowo, co mnie nie dziwi, znając specyfikę prac naukowych profesora Szustakiewicza. Myślę, że doktorant w tym aspekcie bardzo dużo się nauczył od promotora i jego zespołu, stając się ekspertem w pomiarze i analizie właściwości termicznych i mechanicznych polimerów.

Część dotycząca badań komórkowych również przygotowana jest bardzo dobrze. Zapewne jest to zasługa Pani Doktor Rudnickiej i zespołu z Uniwersytetu Łódzkiego. Doktorant właściwie przedstawia uzyskane wyniki. Stosuje w badaniach zarówno kontrolę pozytywną i negatywną, co nie jest standardem w publikacjach naukowych. Wszystkie uzyskane wyniki poddaje testowaniu statystycznemu, budując odpowiednie przedziały ufności. Jest to postępowanie właściwe i rzadko spotykane, które zasługuje na moją pochwałę. W części komórkowej zabrakło mi jedynie testów długoterminowych hodowli komórek kostnych na materiałach i oceny zasiedlania skafoldu przez komórki kostne. Z badań kąta zwilżania za pomocą wody widać, że otrzymane materiały mają charakter hydrofobowy, więc migracja komórek kostnych do wnętrza może być utrudniona i wymaga dalszych badań.

Mimo pewnych niedociągnięć badawczych wyniki uzyskane w badaniach komórkowych świadczą, o otrzymaniu dobrych kandydatów na biomateriały. Wyniki hodowli komórkowych są bardzo obiecujące. Brak cytotoksyczności oraz nasilenie występowania markerów kostnienia



wskazuje duży potencjał do dalszych badań nad otrzymanymi kompozytami, które w mojej ocenie powinny być kontynuowane.

W części związanej z dyskusją wyników, zabrakło mi odniesienia się do literatury. Badania na modelach komórkowych wykorzystujące jako podłoża komórkowe kompozyty PGS z hydroksyapatytem są dość szeroko raportowane przez badaczy. Doktorant mogłaby skomentować czy uzyskał lepsze materiały niż opisane wcześniej w literaturze? Czy testowane materiały mają odmienne cechy użytkowe od innych opisywanych literaturze?

Przytoczone przeze mnie krytyczne uwagi nie umniejszają w żaden sposób osiągnięć Doktoranta. Moja ocena recenzowanej pracy doktorskiej jest pozytywna. Uzyskane wyniki oraz liczba przeprowadzonych eksperymentów świadczą, że Doktorant jest ambitny i lubi podejmować trudne zadania badawcze. Doktorant potrafi prowadzić badania we współpracy z różnymi ośrodkami badawczymi stosując bardzo zróżnicowane metody badawcze. Krytyczna ocena stwierdzeń i niektórych uzyskanych wyników badań ma być wskazówką do dalszych prac nad doskonaleniem warsztatu badacza przez Doktoranta.

Uwagi do pracy: Po zapoznaniu się z rozprawą chciałabym przekazać następujące komentarze i wątpliwości, które powinny być wyjaśnione podczas obrony rozprawy doktorskiej:

- Czy Doktorant przeprowadzał normalizację zmierzonych widm FTIR-ATR? Czy zawsze stosowano taką samą naważkę badanego materiału? Porównywanie ze sobą widm zmierzonych techniką ATR jest obarczone zawsze dużym błędem.
- Czy w czasie procesu sieciowania PGS w 185°C Doktorant obserwował wydzielanie się wody? Czy za każdym razem była to ta sama ilość/objętość wody?
- Dlaczego do sterylizacji została wybrana dawka 35 kGy? Wyroby medyczne najczęściej są sterylizowane niższymi dawkami ok. 25 kGy. Czy tak wysoka dawka nie wpływa na właściwości i czas degradacji materiału?
- Czy dla otrzymanych kompozytów PGS/HAP Doktorant wykonywał pomiary kąta zwilżania cieczą niepolarną? Czy były wykonywane obliczenia swobodnej energii powierzchniowej? Czy SEP otrzymanych kompozytów odpowiada tkance kostnej?
- Czy były wykonywane pomiary twardości otrzymanych potencjalnych wypełnień kostnych?
- Proszę o komentarz w sprawie różnic w module Younga tkanki kostnej i otrzymanych kompozytów PGS/HAP? Wartości te różnią się o kilka rzędów. Czy nie jest to dyskwalifikujące kompozyt w tym zastosowaniu?



Podsumowanie: Pan mgr Paweł Piszko podjął się kompleksowego przeprowadzenia badań na nad opracowaniem i wytworzeniem nowych materiałów do wypełniania ubytków kostnych. Prowadzone badania miały charakter interdyscyplinarny i wymagały współpracy wielośrodkowej oraz zaangażowania specjalistów z różnych dziedzin. Doktorant musiał zastosować wiele technik badawczych z różnych dyscyplin. W efekcie przeprowadzanych badań wykazał na modelu komórkowym, że otrzymane materiały mają potencjał do zastosowania jako wypełnienia kości.

Wszystkie podjęte przez Doktoranta działania pozwalają mi jednoznacznie stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr. Pawła Jakuba Piszko „Materiały kompozytowe na bazie poli(sebacynianu gliceryny) do potencjalnego wykorzystania w inżynierii tkankowej kości” **spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20.07.2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U 2023 r., poz. 742)** i wnioskuje o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów postępowania doktorskiego.



prof. uczelni, dr hab. inż. Agnieszka Gadomska-Gajadur