

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. 6 lipca 2023 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Krokos

zatytułowanej

„Polimerowo-ceramiczne biomateriały do regeneracji tkanki kostnej”.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Anny Krokos została wykonana w Katedrze Inżynierii i Technologii Polimerów, Wydziału Chemicznego w Politechnice Wrocławskiej. Promotorem rozprawy doktorskiej był prof. dr hab. inż. Andrzej Trochimczuk, zaś promotorem pomocniczym dr inż. Małgorzata Gazińska.

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 Doktorantką żadnych badań naukowych oraz, że nie jesteśmy współautorami żadnej pracy naukowej.

Wybór tematyki pracy: Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Anny Krokos 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. W Polsce aktualnie realizowanych jest kilkadziesiąt projektów badawczych skupiających się na tym temacie. Zatem tematyka doktoratu jest bardzo aktualna i dobrze wpisuje się w obecnie prowadzone badania naukowe.

Cel rozprawy: Głównym celem rozprawy było opracowanie i wytworzenie nowych materiałów mających potencjalne zastosowanie w inżynierii tkanki kostnej. Cel miał być realizowany w dwóch wątkach badawczych. W pierwszym była to funkcjonalizacja bioszklą i cząstek hydroksyapatytu za pomocą lizyny i PEG. W drugim wykorzystano kompozyty z PLA modyfikowane hydroksyapatytem i bioszklą. Obydwa wątki badawcze wpisują się w aktualne strategie projektowania i wytwarzania wypełnień kostnych. Wg aktualnych trendów naukowych wykorzystuje się materiały o udowodnionym bezpieczeństwie, biogodności i bioresorbowalności do wytwarzania nowych potencjalnych wyrobów medycznych.



Dzięki temu skraca się czas i koszty badań. Doktorantka w ramach celu badawczego postawiła aż 6 hipotez badawczych, które w kolejnych etapach pracy próbowała zweryfikować.

Ocena ogólna rozprawy: Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Krokos obejmuje ogółem 171 stron maszynopisu komputerowego, zawierającego 73 rysunki, 19 tabel i 198 cytowane źródła literaturowe. Do pracy został dołączony dorobek naukowy Doktorantki, który w mojej ocenie jest bardzo dobry.

Rozprawa doktorska mgr inż. Anny Krokos została przedstawiona w klasycznym układzie, często spotykanym w doktoratach w formie monografii podzielonej na rozdziały z uwzględnieniem wstępu, przeglądu literatury, uwypukleniem celów i hipotez rozprawy, omówieniem stosowanych metod i materiałów, opisem otrzymanych wyników wraz z ich dyskusją oraz wnioskami.

Kolejne rozdziały przeglądu literaturowego dobrze uzasadniają podejmowane działania opisane w części badawczej. Ta część pracy wprowadza czytelnika w zagadnienia badawcze przedstawione w pracy doktorskiej. W kolejnych rozdziałach części literaturowej Doktorantka przedstawia biodegradowalne materiały polimerowe oraz ceramiczne. Dużą uwagę skupia na metodach modyfikacji cząstek ceramicznych za pomocą różnych substancji o działaniu biologicznym. Podkreśla ograniczenia w stosowaniu każdej z omawianych metod. Takie spojrzenie na dostępną literaturę pokazuje dojrzałość naukową Doktorantki i zasługuje na moje uznanie. Jedynym aspektem, którego mi w tej części zabrakło jest podsumowanie przeglądu literatury.

W części dotyczącej sformułowania hipotez badawczych Doktorantka postanawia weryfikować hipotezy w trzech aspektach. Pierwszy odnosi się do stabilności termicznej otrzymanych kompozytów. Co jest rzeczywiście kluczowe z punktu widzenia dalszego przetwórstwa lub formowania końcowego wyrobu medycznego. Drugi aspekt dotyczy wpływu makrostruktury PLA na możliwości formowania rusztowań komórkowych. Trzeci jest związany z odpowiedzią komórkową w kontakcie z opracowanymi materiałami. Jest to hipoteza badawcza bardzo często spotykana w innych pracach naukowych. Wiele grup badawczych testuje różne materiały na bazie PLA do odbudowy komórkowej. Wyniki tych prac pokazują pozytywne oddziaływanie testowanych materiałów na komórki.

Przechodząc do kolejnej części pracy poświęconej metodyce badań, na uznanie zasługuje liczba przeprowadzonych analiz. Doktorantka posłużyła się metodami badawczymi stosowanymi



w chemii polimerów i w inżynierii materiałowej, tj. skaningowa mikroskopia elektronowa, skaningowa kalorymetria różnicowa, termograwimetria, pomiary kąta zwilżania czy spektroskopia w podczerwieni. Dalsze stosowane metody są typowe dla badań komórkowych. Doktorantka wykonała testy cytotoksyczności, prozapalne, LDH oraz ich analizę statystyczną. Przyjęta przez nią metodyka badawcza jest prawidłowa i zgodna z prezentowanym w literaturze protokołem badań komórkowych. Jednocześnie tak szerokie podejście badawcze jest rzadko spotykane w pracach doktorskich. Zastosowanie tych wszystkich metod wymagało od Doktorantki ciągłego rozwoju naukowego i pokonywania własnych ograniczeń badawczych. Jest to postawa, która zasługuje na pochwałę ze strony recenzenta i dobrze rokuje na przyszłość naukową Doktorantki.

Otrzymane wyniki są przedstawione w sposób jasny i klarowny. Doktorantka zamieściła większość otrzymanych wyników w formie tabeli lub wykresów. Takie podejście znacząco ułatwia lekturę doktoratu. Jednak nie ustrzegła się pewnych błędów w opracowaniu wyników. W tabeli 4 (str. 76), podaje zawartości fazy stałej i ciekłej do 6 cyfr znaczących, uważam to za nieprawidłowe. Tym bardziej, że w pierwszym wierszu Doktorantka posługuje się dokładnością do 2 cyfr znaczących.

Część badawcza podzielona jest na dwa wątki, z których każdy mógłby stanowić osobną pracę doktorską. Ilość wykonanych modyfikacji oraz otrzymanych wyników jest imponująca, co świadczy niewątpliwie o dużej pracowitości Doktorantki. Cała część badawcza jest przygotowana w sposób bardzo sumienny z dużą dbałością o szczegóły. Widać, że Doktorantka biegle posługuje się stosowaną metodyką badawczą, a interpretacja uzyskanych wyników nie sprawia jej trudności. Eksperymenty zaplanowane są właściwie i mogą być między sobą porównywane ze względu na ustandaryzowanie warunków ich prowadzenia. Cały zgromadzony materiał jest kompletny i może stanowić przedmiot kilku publikacji naukowych.

W kolejnych etapach badań własnych Doktorantka przedstawia wyniki dotyczące wprowadzanych przez siebie modyfikacji kompozytów na bazie PLA i hydroksyapatytu (HAP). Na kolejnych stronach przedstawia szereg analiz potwierdzających uzyskane produkty reakcji. Mam tutaj pewną wątpliwość czy Doktorantka rzeczywiście uzyskała wiązanie chemiczne między HAP a lizyną. Z zamieszczonych fragmentów widm IR trudno to stwierdzić. Może należało się tutaj posłużyć dodatkowymi analizami DSC lub analizą elementarną. Doktorantka większość otrzymanych przez siebie kompozytów charakteryzuje za pomocą TGA i DSC. Wyniki tych analiz



są okraszone obszernym komentarzem ze strony Autorki dotyczącym wpływu poszczególnych składników na otrzymany kompozyt. Rozprawę kończy rozdział z wnioskami, które korespondują z postawionymi przez Doktorantkę celami badawczymi.

Ocena merytoryczna rozprawy: Praca napisana jest jasnym i zwięzłym językiem. Doktorantka posługuje się właściwą nomenklaturą, jednak zdarzają się niestety błędy językowe. Przykładowo nie rozumiem o jakim wiązaniu między napelniaczem a matrycą polimerową pisze Doktorantka na str. 57. W moim odczuciu jest to oddziaływanie fizyczne, a nie chemiczne. Nie zgadzam się też ze stwierdzeniem, że „ Polikondensacja laktydu pozwala na uzyskanie produktu o niskiej masie cząsteczkowej ponieważ trudno jest usunąć wodę” (str. 24). Laktyd jest cyklicznym dimerem kwasu mlekowego i nie kondensuje z wydzieleniem produktu małowcząsteczkowego. Ulega polimeryzacji z otwarciem pierścienia (ROP), w wyniku której otrzymuje się PLA o dużym ciężarze cząsteczkowym. W pracy pojawiają się wartości modułu sprężystości kości, jednak Autorka nie podaje w jakiej metodzie jest on wyznaczony. A wartość modułu Younga kości silnie zależy od metody wyznaczania (rozciąganie 1,6 MPa, ściskanie 0,9 MPa). W badaniach degradacji otrzymanych przez siebie kompozytów Doktorantka posługuje się jedynie ubytkiem masy. W mojej ocenie ważniejsze jest badanie produktów degradacji niż samego ubytku masy. Degradacja w organizmach żywych otrzymanych kompozytów prowadzi do uwolnienia kwasu mlekowego, który może zakwaszać środowisko. Może to prowadzić do wystąpienia stanu zapalnego. Ilość uwolnionego kwasu mlekowego w jednostce czasu będzie kluczowym parametrem w badaniach na zwierzętach.

Wyniki uzyskane w badaniach komórkowych świadczą, o otrzymaniu dobrych kandydatów na biomateriały. Wyniki hodowli komórkowych są bardzo obiecujące. Jednak brakuje w nich testowania ich istotności. Doktorantka posługuje się jedynie słupkami błędów, zamiast zbudować przedział ufności i przetestować statystycznie otrzymane wyniki. Brak występowania czynników prozapalnych 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 PLA z hydroksyapatytem są dość szeroko raportowane przez badaczy. Doktorantka mogłaby skomentować czy uzyskała lepsze materiały niż opisane wcześniej w literaturze? Czy testowane przez nią materiały mają odmiennie cechy użytkowe od innych opisywanych w literaturze?



Przytoczone przeze mnie krytyczne uwagi nie umniejszają w żaden sposób osiągnięć Doktorantki. Moja ocena recenzowanej pracy doktorskiej jest bardzo pozytywna. Uzyskane wyniki oraz liczba przeprowadzonych eksperymentów świadczą, że Doktorantka jest specjalistką w dziedzinie pracy doktorskiej. Po lekturze pracy doktorskiej odniosłam wrażenie, że realizacja tego tematu była dla Doktorantki pasją i przyjemnością, a nie tylko pracą narzuconą przez Promotorów. Mam też duże uznanie dla Doktorantki związane z ambitnymi celami badawczymi jakie sobie postawiła i je zrealizowała. Krytyczna ocena stwierdzeń i niektórych uzyskanych wyników badań ma być wskazówką do dalszych prac nad doskonaleniem warsztatu badacza.

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

- Czy Doktorantka badała rentgenograficznie stosowany przez siebie HAP? Czy jego forma i skład ulegała zmianie w czasie prowadzenia modyfikacji?
- Czy Doktorantka rozważała wykonanie analizy DSC w celu potwierdzenia otrzymanego wiązania chemicznego HAP/LYS? Dodatkowo proszę o zaprezentowanie całego widma IR i omówienie obserwowanych sygnałów świadczących o powstaniu wiązania chemicznego.
- W czasie badań, otrzymane folie kompozytowe (str. 72) były sterylizowane w temp. 121°C pod ciśnieniem 1,05 bar i przez 22 min. Czy ta temperatura nie wpływała na procesy degradacji stosowanych polimerów lub ich krystalizację?
- Czy dla otrzymanych kompozytów PLA/HAP, PLA/HAP/Lys i itp. Doktorantka wykonywała pomiary kąta zwilżania cieczą niepolarną? Czy były wykonywane obliczenia swobodnej energii powierzchniowej?
- Czy były wykonywane pomiary twardości otrzymanych potencjalnych wypełnień kostnych?

Podsumowanie: Pani mgr inż. Anna Krokos podjęła się kompleksowego przeprowadzenia badań na nad opracowaniem i wytworzeniem nowych materiałów do wypełniania ubytków kostnych. Prowadzone przez nią badania miały charakter interdyscyplinarny i wymagały współpracy wielośrodkowej oraz zaangażowania specjalistów z różnych dziedzin. Doktorantka musiała zastosować wiele technik badawczych z różnych dyscyplin. W efekcie przeprowadzanych badań wykazała, że otrzymane przez nią materiały mają potencjał do zastosowania jako wypełnienia kości.



Wszystkie podjęte przez Doktorantkę działania pozwalają mi jednoznacznie stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr inż. Anny Krokos „Polimerowo-ceramiczne biomateriały do regeneracji tkanki kostnej” **spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20.07.2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r poz. 1688)** i wnioskuje o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Biorąc pod uwagę zakres wykonanych badań, interdyscyplinarny charakter pracy, współpracę wielośrodkową w tym międzynarodową oraz dorobek publikacyjny Doktorantki składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

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