

Dr hab. Anna Karewicz
Zespół Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów
Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
Ul. Gronostajowa 2



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kraków dnia 18 sierpnia 2022

Recenzja rozprawy doktorskiej
pt. „Właściwości fizykochemiczne mieszanin i kompozytów
dwu- i trójskładnikowych na bazie chitozanu, kolagenu i
fibroiny jedwabiu”
autorstwa mgr Sylwii Grabskiej-Zielińskiej

Wydział Chemii

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Sylwii Grabskiej-Zielińskiej zatytułowana „Właściwości fizykochemiczne mieszanin i kompozytów dwu- i trójskładnikowych na bazie chitozanu, kolagenu i fibroiny jedwabiu” została wykonana w Katedrze Chemii Biomateriałów i Kosmetyków na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Aliny Sionkowskiej. Promotorem pomocniczym rozprawy była dr hab. Katarzyna Lewandowska, prof. UMK.

Ze względu na starzenie się społeczeństw, w szczególności krajów wysoko rozwiniętych, jak również na niewłaściwy, siedzący tryb życia i nieprawidłową dietę, prowadzące do otyłości i zwyrodnień kostnych, systematycznie rośnie liczba osób z chorobami zwyrodnieniowymi kości takimi jak osteoporoza, osteomalacja czy nowotwory kości. Jednocześnie ze względu na gwałtowny rozwój motoryzacji zwiększa się również ilość urazów kostnych spowodowanych wypadkami. Stąd naukowcy nieustannie poszukują nowych, lepszych wypełnień kostnych, w tym takich, które nie tylko zastępują utracony lub usunięty fragment kości, ale stanowią tymczasowe, rusztowanie dla komórek kostnych. Takie rusztowanie może stanowić środowisko aktywnie wspomagające różnicowanie i namnażanie osteoblastów i odbudowę tkanki kostnej pacjenta i jednocześnie samo może ulegać stopniowej degradacji. Jest to rozwiązanie optymalne, pozwalające na stopniowe odtworzenie tkanki pacjenta przy jednoczesnym, również stopniowym,

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



usuwaniu wprowadzonego, obcego materiału. Takie wypełnienia, o ile spełniają odpowiednie wymogi, są znacznie lepsze od popularnie stosowanych implantów metalicznych i ceramicznych. Jednak wymagania stawiane takim materiałom są bardzo wysokie: muszą one być biozgodne, biodegradowalne z odpowiednią szybkością, posiadać dobre właściwości mechaniczne zbliżone do tkanki kostnej oraz tworzyć odpowiednie warunki do namnażania komórek kostnych (osteoblastów), takie jak wysoka porowatość, duże (200-300 μm) i połączone pory czy zdolność do aktywowania procesów biomineralizacji. W ramach swojej pracy doktorskiej Pani mgr Sylwia Grabska-Zielińska zbadła szereg biomateriałów opartych na polimerach pochodzenia naturalnego: fibroinie jedwabiu (SF), kolagenie (Coll) oraz chitozanie (CTS) w celu znalezienia optymalnego rusztowania komórkowego mogącego stanowić wypełnienie niewielkich ubytków kostnych. Możliwość zastosowania wspomnianych polimerów oraz niektórych ich połączeń dwuskładnikowych została już opisana w literaturze. Nowością proponowanej pracy były kompozyty trójskładnikowe oraz opracowanie i porównanie różnych metod sieciowania łańcuchów wspomnianych polimerów w celu uzyskania materiałów o pożądanych właściwościach.

Przedmiotem rozprawy doktorskiej było 5 powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach z Listy Filadelfijskiej o sumarycznym wskaźniku cytowań (Impact Factor) IF = 16,883 oraz łącznej ilości punktów ministerialnych równej 560. Wszystkie artykuły są ściśle ze sobą związane tematyką i metodyką badań i stanowią spójny cykl publikacji opublikowanych w latach 2020-2021. Z wyjątkiem jednego artykułu we wszystkich pozostałych Pani Grabska-Zielińska jest pierwszym autorem, zaś w 3 z nich – autorem korespondencyjnym. Zgodnie z oświadczeniami Doktorantki oraz współautorów jej udział w jednej pracy oznaczonej D2 był na poziomie 60 %, zaś w pozostałych był w zakresie 80% - 90 %. **Mogę więc jednoznacznie stwierdzić, że Pani Grabska-Zielińska miała wiodący udział we wszystkich publikacjach cyklu stanowiącego podstawę przedłożonej mi do oceny pracy doktorskiej, oraz że prace te zostały opublikowane w bardzo dobrych, recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym.**



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Chemii

Doktorantka może się pochwalić bardzo dobrym dorobkiem naukowym – opublikowała dotąd 27 artykułów, z czego 21 w czasopismach z listy Filadelfijskiej, jak również 7 rozdziałów w książkach i monografiach (jeden w wydawnictwie Taylor & Francis oraz sześć w wydawnictwach uniwersyteckich); swoje wyniki prezentowała również w formie 14 komunikatów ustnych i 23 posterów na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Pani Grabska-Zielińska była również kierownikiem grantu Preludium, dwóch grantów NAWA oraz czterech grantów Dziekana Wydziału Chemii UMK dla Młodych Naukowców, a także wykonawcą w grantcie OPUS. Odbyla też dwa staże naukowe w Universidade de Porto (Portugalia) pod opieką prof. F.J. Monteiro oraz w Katedrze Chemii Biomateriałów i Kompozytów AGH w Krakowie pod opieką prof. Elżbiety Pamuły. Doktorantka uzyskała również 5 Zespołowych Nagród rektora UMK za osiągnięcia w dziedzinie naukowo badawczej oraz nagrodę Rektora UMK za wysoko punktowaną publikację w czasopiśmie Materials.

Praca doktorska jest złożona z 20-stronnicowego, krótkiego opracowania, w którym Doktorantka przedstawiła motywację badań i stan wiedzy dotyczący rusztowań komórkowych i fibroiny jedwabiu, a następnie cel rozprawy doktorskiej i krótkie omówienie prac, na których oparła dysertację. W tabelach 2-8 przedstawiła porównanie właściwości fizykochemicznych wszystkich otrzymanych w ramach pracy rusztowań. Opracowanie zakończyła krótkimi wnioskami. Opracowanie jest dość skrótowe, co jest w pewnym stopniu uzasadnione obecnością w cyklu obszernej pracy przeglądowej przedstawiającej stan wiedzy dotyczący materiałów opartych na fibroinie jedwabiu do zastosowań biomedycznych. Wydaje się, że rozdział 2 opracowania jest bardziej ogólny niż sugeruje to jego tytuł - dotyczy raczej rusztowań do naprawy kości opartych na hydrożelach z polimerów naturalnych niż fibroiny jedwabiu i mógłby z powodzeniem zostać włączony do Wprowadzenia. Cele badań zostały jasno sformułowane, zaś krótkie omówienie otrzymanych układów (rozdział 4) jest bardzo dobrym, syntetycznym opisem eksperymentów wykonanych w ramach załączonych publikacji. Dołączenie tabeli zbierających właściwości fizykochemiczne wszystkich materiałów było bardzo dobrym pomysłem, ponieważ pozwalają

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

one na porównanie tych właściwości również pomiędzy publikacjami na których oparta jest rozprawa.

Publikacja D1 może z powodzeniem stanowić odpowiednik części literaturowej klasycznych prac doktorskich, zwłaszcza, że Doktorantka zadeklarowała 90 % udział autorski w tym artykule. Przedstawia ona stan badań nad zastosowaniem fibroiny jedwabiu jako biomateriału, głównie w zastosowaniach z dziedziny inżynierii tkankowej i w kompozytach z innymi polimerami naturalnymi, choć nie tylko. Autorzy omawiają wymagania dotyczące materiałów stanowiących rusztowania komórkowe w inżynierii tkankowej, budowę i sposoby otrzymywania fibroiny jedwabiu, a następnie różne formy materiałów otrzymywanych z jej udziałem – włókna, cząstki, porowate struktury trójwymiarowe takie jak rusztowania, pianki czy gąbki, filmy oraz hydro- i aerożele. Duży rozdział publikacji poświęcony jest dwuskładnikowym blendom fibroiny jedwabiu z polimerami stosowanymi w pracy (chitozanem i kolagenem), jak również z alginianem sodu, kwasem hialuronowym oraz innymi polimerami naturalnymi i syntetycznymi. Omówione zostały także opisane już w literaturze rusztowania na bazie mieszanin trójskładnikowych fibroiny z innymi polimerami oraz stosowane domieszki nieorganiczne. Kolejno Autorzy przedstawili sposoby sieciowania wcześniej omówionych układów (chemiczne i fizyczne oraz z wykorzystaniem enzymów).

Publikacja D2 stanowi niejako wstęp do dalszych badań nad układami trójskładnikowymi. Autorzy zbadali układy dwuskładnikowe fibroiny jedwabiu z kolagenem sieciowane chemicznie z wykorzystaniem układu sprzęgającego złożonego z 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu (EDC) oraz N-hydroksymiddu kwasu bursztynowego (NHS). Opracowana została metodyka otrzymywania fibroiny jedwabiu z kokonów jedwabników. Analiza różnych składów oraz wpływu procesu sieciowania pozwoliła wskazać układ SF:Coll 50:50 jako najlepszy pod kątem właściwości mechanicznych, oraz wskazała na istotną i pozytywną rolę procesu sieciowania.

Wydział Chemii

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



Publikacja D3 omawia wyniki badań nad układem trójskładnikowym, w którym jako środek sieciujący zastosowano utleniony polisacharyd, skrobię dialdehydową (DAS). W badaniach porównano materiały otrzymane z fibroiny jedwabiu (SF), z kolagenu (Coll), z blendy SF/Coll w stosunku wagowym 50/50 oraz z blendy SF:Coll 50/50 z 25 % domieszką chitozanu (CTS), w tym układy sieciowane DAS oraz niesieciowane. Otrzymane materiały porównano pod kątem ich porowatości, gęstości, mikrostruktury, zdolności do pochłaniania wody oraz cytotoksyczności wobec komórek MG-63 stanowiących model osteoblastów. Materiały dwu i trójskładnikowe charakteryzowały się większym pęcznieniem i porowatością; wykazano również, że rusztowania SF/Coll i SF/Coll/CTS mają właściwości odpowiednie dla inżynierii tkankowej. Związek sieciujący wpływał na właściwości fizykochemiczne materiałów, zmniejszając porowatość i zwiększając pęcznienie, natomiast nie powodował zwiększonej cytotoksyczności względem osteoblastów. Jednocześnie proces sieciowania znacząco zwiększał trwałość materiałów.

Wydział Chemii

Publikacje D4 i D5 były rozszerzeniem badań wykonanych w ramach pracy D3 pod kątem zarówno analizowanych składów mieszanin trójskładnikowych oraz stosowanego środka sieciującego, jak i wykonanej charakterystyki fizykochemicznej. Autorzy zbadali 9 różnych blend zawierających wszystkie trzy pary polimerów tj. SF/Coll, SF/CTS i Coll/CTS w stosunku wagowym 50/50 oraz domieszkę trzeciego ze stosowanych polimerów w ilości 10, 20 i 30 %. Wszystkie materiały były następnie sieciowane z wykorzystaniem gliksalu (publikacja D4) lub czynników EDC i NHS (publikacja D5). Obok badań porozymetrycznych, stopnia pęcznienia i mikrostruktury rusztowań Autorzy zbadali również właściwości mechaniczne otrzymanych materiałów, co było bardzo trafną decyzją w kontekście proponowanych zastosowań w naprawie ubytków kostnych. Zauważono, że gdy zastosowała układ EDC/NHS do sieciowania, obecność kolagenu w otrzymanych w ten sposób rusztowaniach poprawiała stopień spęcznienia – najwyższe jego wartości uzyskiwane były dla matryc zawierających największą ilość kolagenu, zwłaszcza wówczas, gdy znaczny udział w składzie hydrożelu miała również fibroina jedwabiu. Nieco zaskakujące były natomiast wyniki uzyskane dla

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



układów Coll/CTS zawierających różne ilości SF – największe pęcznienie obserwowano dla zawartości fibroiny równej 20 %, zaś mniejsze, gdy zawartości te wynosiły odpowiednio 10 % i 30 %. W przypadku materiałów sieciowanych glioksałem obserwowana tendencja była inna – najszybciej i najlepiej pęczniały usieciowane glioksałem materiały SF/CTS z domieszką kolagenu. A zatem nie tylko skład rusztowania, ale i rodzaj związku sieciującego ma istotny wpływ na pęcznienie badanych materiałów. Lepsze właściwości mechaniczne uzyskano dla materiałów zawierających chitozan oraz fibroinę jedwabiu, zaś kolagen wpływał negatywnie na wytrzymałość rusztowań, i to bez względu na związek sieciujący. Z kolei badania biologiczne wskazały na kolagen oraz fibroinę jedwabiu jako składniki matrycy rusztowania sprzyjające przeżywalności i namnażaniu osteoblastów. Jednocześnie wszystkie otrzymane materiały pozwalały na proliferację komórek osteoblastycznych, co pozwoliło Autorom wysunąć uzasadniony wniosek, iż stosowane sieciowacze (glioksal i EDC/NHS) nie wpływają negatywnie na przeżywalność tych komórek.

Omówione badania w sposób rzetelny i systematyczny charakteryzują szereg nowych materiałów opartych na trójskładnikowych blendach polimerów naturalnych: fibroiny jedwabiu, kolagenu i chitozanu. Polimery te, ze względu na ich szczególne właściwości, w tym biogodność i bioaktywność, są powszechnie uznane za bardzo dobre składniki rusztowań komórkowych. W pracy Doktorantka szczegółowo zbadała właściwości kilkudziesięciu różnych hydrożeli, co pozwoliło na wykazanie pewnych zależności pomiędzy składem materiału i środkiem sieciującym, a właściwościami istotnymi dla zastosowania w inżynierii tkankowej, a także wyselekcjonowanie materiałów najbardziej obiecujących w kontekście potencjalnych aplikacji.

Do roli recenzenta należy, obok ogólnej oceny pracy, również przedstawienie uwag polemicznych i wskazanie ewentualnych uchybień. **W związku z tym chciałabym poniżej zebrać kilka wątpliwości i uwag dotyczących pracy.**

Doktorantka wyizolowała z materiałów biologicznych zarówno fibroinę jedwabiu (z kokonów jedwabnika morwowego), jak i kolagen (z ogonów

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



szczurzych), co należy docenić, gdyż stanowiło to dodatkowe wyzwanie i wkład w przedstawione prace. Szkoda jednak, że nie pojawiły się w pracy informacje na temat charakterystyki wyekstrahowanych polimerów – ich czystości czy typu otrzymanego kolagenu. Zabrakło mi również wyjaśnienia, dlaczego po uzyskaniu mieszaniny polimerów, przed procesem liofilizacji lub sieciowania przeprowadzano dializę, choć domyślam się, iż chodziło o usunięcie kwasu i soli użytych do rozpuszczenia składników (SF i CTS). Doktorantka zwróciła również uwagę na stronie 16 Opracowania, że procedura sieciowania była inna w przypadku układu sprzęgającego EDC/NHS niż w przypadku pozostałych związków sieciujących, ale nie wyjaśniła powodu tej zmiany.

Trochę szkoda, że biorąc pod uwagę proponowane zastosowania otrzymywanych materiałów Doktorantka nie zbadała szerzej ich bioaktywności - przykładowo czy na proponowanych rusztowaniach zachodzi i w jakim zakresie proces biomineralizacji w warunkach symulujących fizjologiczne np. w medium SBF (Simulated Body Fluid). Wiadomo, że kolagen sprzyja zachodzeniu tego procesu. Ważne byłoby również określenie szybkości degradacji otrzymanych materiałów.

W Tabeli 1 ten sam układ, tj. SF i Coll zmieszane w stosunku wagowym 50/50, jest wymieniony dwa razy z dwoma różnymi oznaczeniami – nawet jeśli w dwu różnych publikacjach ten sam układ został oznaczony różnie, sądzę, że lepiej byłoby zaznaczyć go w tabeli raz i wskazać dla niego po prostu dwa różne oznaczenia. W publikacji D4 znalazłam również skróty Coll/CTS oraz SF/CTS, zatem jeśli skrót SF/Coll znalazł się w Tabeli 1, to pozostałe również należało w niej uwzględnić. Na stronie 18 Opracowania Doktorantka pomyłkowo użyła skrótu SF90:10SF, zapewne chodziło o SF90:10Coll. Podobnie, na rysunku 5 (Figure 5) w publikacji D4 panel dolny powinien być oznaczony 500x, a nie 150x. Oba te błędy są typowymi pomyłkami edytorskimi, których trudno uniknąć.

Wszystkie powyższe uwagi mają jedynie charakter polemiczny lub wskazują na drobne błędy, które są nieuniknione podczas pisania tego typu obszernej



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

pracy i nie mają wpływu na moją pozytywną ocenę zarówno dokonań naukowych Doktorantki opisanych w recenzowanej pracy jak i samej pracy.

Podsumowując, badania przeprowadzone przez Panią mgr. stanowią istotny wkład w opracowanie i szczegółową charakterystykę nowych biomateriałów w postaci rusztowań utworzonych z trójskładnikowych blend fibroiny jedwabiu, kolagenu i chitozanu. Biomateriały te wykazują wysoki potencjał jako rusztowania komórkowe do zastosowania w leczeniu niewielkich ubytków kostnych.

Wydział Chemii

Stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszelkie wymogi stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 *Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 nr 65 poz 595, z późniejszymi zmianami)* oraz w *Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodach doktorskim i habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora i wnioskuje o dopuszczenie Pani mgr Sylwii Grabskiej-Zielińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.*

Dr hab. Anna Karewicz, prof. UJ

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl