

Opinia

na temat rozprawy doktorskiej nt. „Opracowywanie, otrzymywanie i badanie rusztowań komórkowych do hodowli chondrocytów lub komórek macierzystych do regeneracji chrząstki stawowej” wykonanej przez mgr inż. Monikę Wasylęczko pod naukowym kierownictwem prof. dr hab. inż. Andrzeja Chwojnowskiego

1. Ważność podjętej tematyki

Praca doktorska Pani Moniki Wasylęczko wychodzi naprzeciw wyzwaniom współczesnej medycyny. W chwili obecnej nie ma skutecznej terapii regenerującej ubytki chrząstki stawowej, która dotyczy coraz większej liczby pacjentów, z uwagi na dłuższy czas życia, zwiększoną aktywność fizyczną, w tym uprawianie sportów ekstremalnych czy pojawiające się coraz częściej u ludzi procesy chorobowe na skutek czynników genetycznych, czy autoagresji.

Obecnie stosowane terapie tj. autologiczna chondrogeneza indukowana macierzą (AMIC) czy autologiczny przeszczep chondrocytów (ACI) nie zapewniają długoterminowego efektu. Dlatego też opracowanie rusztowania komórkowego służącego jako macierz zewnątrzkomórkowa dla komórek macierzystych czy chondrocytów pozwalająca na ich zasiedlenie i funkcjonowanie jest szansą na rozwiązanie długoterminowe.

W pracy podjęto próbę opracowania takich nowych rusztowań, stąd mając powyższe na względzie, tematykę recenzowanej rozprawy doktorskiej uważam za bardzo aktualną, wartą dogłębnych badań.

2. Struktura pracy

Praca doktorska została oparta na sześciu anglojęzycznych publikacjach opublikowanych w latach 2020-2023, do których przygotowano kilkudziesięciostronicowy przewodnik. Publikacje są wieloautorskie, przy czym w trzech z nich Doktorantka jest pierwszym autorem. Publikacje zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach: jedna z nich *Biocybernetics and Biomedical Engineering* ma 200 pkt. MNiSW, dwie *Molecules* and *Pharmaceutics* mają po 140 pkt., zaś trzy *Membranes*, *Polymers* i *Desalination and Water Treatment* 100 pkt. Współautorzy prac dołączyli oświadczenia o ich wkładzie w publikację.

Przewodnik został przygotowany w strukturze typowej dla prac naukowych laboratoryjnych. Składa z głównych części *Wprowadzenie i cel pracy*, *Przegląd literatury*, który zakończono podsumowaniem i wnioskami z literatury, *Cel pracy oraz tezy badawcze*, *Omówienie prac własnych*, *Dyskusja* i *Podsumowanie*. Oddzielne rozdziały stanowi *Bibliografia* i *Wykaz skrótów*. Do przewodnika dołączono także streszczenie w języku polskim i angielskim.

3. Cel pracy

Celem pracy było opracowanie nowych syntetycznych rusztowań do hodowli chondrocytów lub komórek macierzystych na bazie membran. Takie rusztowania muszą zostać precyzyjnie zaprojektowane, tak by tymczasowo naśladować właściwości natywnej macierzy chrząstki szklistej.

Jako szczegółowe cele pracy postawiono: 1'opracowanie sposobu otrzymywania nowych rusztowań syntetycznych z biomateriałów tj. PLGA z PUR oraz PES metodą inwersji faz z dodatkiem włókniny oraz prekursorów porów; 2'dobór prekursorów (generatorów porów) 3' otrzymanie rusztowań z PES; 4' przeprowadzenie badań *in vivo* dla rusztowań na bazie PLGA i PES.

Opracowane rusztowania poddawane były szczegółowym badaniom: analizie struktury pod kątem wielkości, rozmieszczenia, kształtu i objętości porów; ocenie wytrzymałości mechanicznej; określeniu cytotoksyczności; określeniu czasu degradacji w różnych mediach. Ponadto wybrane rusztowania testowane były w badaniach *in vitro* (obserwacja chondrocytów, żywotność komórek, analiza elementarna, barwienie) oraz w badaniach *in vivo*

z wykorzystaniem modelu zwierzęcego (królika). Badania *in vivo* prowadzone były we współpracy z ortopedami.

4. Szczegółowy opis pracy

Przewodnik do artykułów wchodzących w skład rozprawy rozpoczyna dość obszerny rozdział dotyczący przeglądu literatury. Wprowadza on w sposób właściwy czytelnika w tematykę badań opisując po kolei problem medyczny, jakim jest uszkodzenie chrząstki stawowej i metody leczenia tego defektu. Obecnie najbardziej obiecujące metody zmierzające do odtworzenia chrząstki szklistej to metoda ACI (autologiczny przeszczep chondrocytów) oraz metoda AMIC (autologiczna chondrogenesa indukowana macierzą). Na chwilę obecną w obu wspomnianych metodach możliwe jest uzyskanie jedynie tkanki włóknisto-szklistej o właściwościach zbliżonych do chrząstki szklistej. Dalej opisano wymagania i materiały stosowane dla rusztowań dla hodowli chondrocytów, których dotyczyła bezpośrednio recenzowana praca doktorska.

Część druga przewodnika to opis badań własnych w nawiązaniu do publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Wszystkie publikacje zostały opublikowane w czasopismach o wysokim IF.

Publikacja 1 pt. *“Review of Synthetic and Hybrids Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering”* została opublikowana w roku 2020 w *“Membranes”* (IF=3.6). Jest to praca rozpoczynająca pracę Doktorantki nad opracowaniem rusztowań. Stąd też jest to praca przeglądowa dotycząca rozwiązań do regeneracji chrząstki stawowej. Publikacja ta liczy 197 cytowanych publikacji, co wskazuje na bardzo szerokie podejście do tematu i na tym etapie wykonywania pracy doktorskiej bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki do podjęcia badań.

Publikacja 2 pt. *“Polyester membranes as 3D scaffolds for cell culture”* została opublikowana w roku 2021 w *“Desalination and Water Treatment”* (IF=1.1). Praca dotyczy opracowania innowacyjnej struktury na bazie PLGA (poli(L-laktydu-ko-ε-kaprolaktonu) przy zastosowaniu włókniny z poliwinylpirolidonu (PVP) 1,3 MDa i polimeru Pluronic 127-F oraz drugiej przy zastosowaniu włókniny z żelatyny i polimeru PVP 10 kDa. Struktury zostały szeroko zbadane m.in. poprzez wykonanie zdjęć SEM. Kluczowe było określenie wielkości i rozłożenie porów. Zbadana została także szybkość rozkładu uzyskanych rusztowań.

Publikacja 3 pt. *"Scaffolds for cartilage tissue engineering from a blend of polyethersulfone and polyurethane polymers"* została opublikowana w roku 2023 w *"Molecules"* (IF=4.6). Badania opisane w tejże publikacji dotyczyły otrzymania i charakterystyki rusztowań na bazie polietersulfonu (PES) i poliuretanu (PUR) przy zastosowaniu różnych prekursorów makroporów. Otrzymany materiał szczegółowo scharakteryzowano: wykonano obrazy SEM, określono rozkład porów, stopień hydrofilowości, właściwości mechaniczne oraz utratę masy w czasie.

Publikacja 4 pt. *"Three-dimensional scaffolds for bioengineering of cartilage tissue"* została opublikowana w roku 2022 w *"Biocybernetics and Biomedical Engineering"* (IF=6.6). Badania opisane w pracy dotyczyły hodowli *in vitro* z wykorzystaniem ludzkich chondrocytów. W badaniach porównano rusztowania na bazie polietersulfonu (PES) oraz-poli(L-lactydu) (PLLA). Uzyskane wyniki badań wskazały na przewagę rusztowania na bazie polietersulfonu, którego otrzymanie opisano w publikacji 3. Dodatkowo po zakończonej hodowli chondrocytów odzyskano białko, które, jak potwierdzono w badaniach SEM, miało strukturę podobną do natywnej tkanki chrzęstnej.

Publikacja 5 pt. *"Intraarticular implementation of autologous chondrocytes placed on collagen or polyethersulfone scaffolds: an experimental study in rabbits"* została opublikowana w roku 2023 w *"Polymers"* (IF=4.9). Wyniki przedstawione w pracy dotyczą badań *in vivo*, przy wykorzystaniu królika jako zwierzęcia modelowego. W badaniach porównano wybrane w publikacji 4 rusztowanie na bazie PES z preparatem komercyjnym na bazie kolagenu. Badania opublikowane w tejże pracy mają charakter całkowicie innowatorski. Badania prowadzono na 64 królikach wykorzystując obie kończyny tylnie. Badania prowadzone były metodą ACI, czyli z wykorzystaniem przeszczepu chondrocytów. Badania zakończyły się sukcesem, który można uznać także za sukces tejże pracy doktorskiej. Ocena makro – i mikroskopowa udowodniła, że jakość zregenerowanej tkanki była podobna po przeszczepieniu komórek zaszczipionych na membranach PES, jak i na kolagenowym preparacie handlowym. Zregenerowana tkanka w ubytkach osiągnęła dojrzałość po 12 tygodniach, zaś po 52 tygodniach wykazywała nadal morfologię chrząstki szklistej. Uzyskano 95% regenerację ubytków. Badania histopatologiczne wykluczyły pozostałości fragmentów rusztowania PES.

Publikacja 6 pt. "*Regeneration of articular cartilage using membranes of polyester scaffolds in a rabbit model*" została opublikowana w roku 2022 w "*Pharmaceutics*" (IF=5.5).

Badania opisane w pracy dotyczą podobnie jak badania zawarte w publikacji 5 badań *in vivo*, ale z wykorzystaniem rusztowań na bazie PLCA, których otrzymanie opisano w publikacji 2. W tym przypadku zastosowano metodę AMIC, która bazuje na komórkach macierzystych. Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie materiału PLCA sprzyjało uzyskaniu lepszych efektów w porównaniu z grupą kontrolną (ubytki niewypełnione). Wskazano, że rusztowanie PLCA zawierające włókninę z poliwinylpirolidonu jest lepsze mechanicznie niż rusztowanie PLCA zawierające włókninę z żelatyny.

Wszystkie badania opisane w artykułach i w przewodniku zostały wykonane zgodnie z obowiązującymi procedurami. Badania mają charakter innowacyjny i aplikacyjny. Pozytywne wyniki z badań przeprowadzonych *in vivo* wskazują, że opracowane rusztowania są gotowe do dalszych etapów badań poprzedzających wdrożenie.

5. Zagadnienia do poruszenia w czasie obrony

Przewodnik w sposób logiczny prowadzi czytelnika przez kolejne etapy badań. Jest napisany ładnym naukowym językiem, został przygotowany starannie, rysunki i tabele są czytelne. Bardzo liczna literatura (175 pozycji) jest cytowana i zestawiona poprawnie. Od strony edytorskiej mam jedynie uwagę do numeracji rozdziałów. Rozdział „*Omówienie prac własnych*” powinien zostać napisany drukowanymi literami, bo w zaprezentowanej formie przynależy jakby do rozdziału *Cel pracy*. Uwaga ta dotyczy także rozdziału „*Dyskusja*” i „*Podsumowanie*”.

W czasie publicznej obrony pracy doktorskiej chciałabym prosić Doktorantkę o następujące informacje/wyjaśnienia:

- czy grubość membrany jest kluczowym parametrem? Jeżeli tak, w jakim zakresie można nią sterować stosując opisane metody?
- czas monitorowania w badaniach *in vivo*? W przypadku metody ACI było to 52 tygodnie, w przypadku AMIC 24 tygodnie. Czy można uznać, że sukces uzyskany po tym czasie daje gwarancję trwałego efektu?

- w ostatnim zdaniu podsumowania zawarto informację, że opracowane materiały mogłyby zostać zastosowane także do rekonstrukcji nosa. Dlaczego akurat nosa a ucha już nie? Czy uzyskane wyniki badań mogłyby w jakiś sposób przysłużyć się także regeneracji ubytków kostnych lub tkanek miękkich?

6. Dorobek naukowy

Według załączonego raportu dotyczącego dorobku poza sześcioma pracami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej, Pani mgr inż. Monika Wasyleczko jest współautorką jedenastu publikacji. Wszystkie zostały opublikowane w czasopismach o wysokiej punktacji na liście MNiSW. Jest także współautorką czterech patentów oraz jedenastu wystąpień konferencyjnych.

Na dzień wykonywania recenzji, według bazy Web of Science, liczba cytowań zamieszczonych w niej 17 prac współautorstwa Pani mgr inż. Monika Wasyleczko wynosi 193, zaś Indeks Hirscha wynosi 8. Można te parametry uznać jako dorobek wyróżniający.

Reasumując uważam, że Pani mgr inż. Monika Wasyleczko rozwiązała z powodzeniem zadania będące celem Jej rozprawy doktorskiej, która stanowi oryginalne, bogate w liczne eksperymenty osiągnięcie naukowe. Wykazała się przy tym wiedzą oczekiwaną od kandydatki do stopnia doktora w dyscyplinie naukowej Inżynieria Biomedyczna.

Uważam, że przedłożona rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane formalnie i zwyczajowo pracom doktorskim i stawiam wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Monika Wasyleczko do publicznej jej obrony. Równocześnie mając na uwadze szeroki zakres przeprowadzonych prac, uzyskanie nowatorskich rozwiązań, bardzo dobry dorobek naukowy z badań wykonanych w ramach pracy doktorskiej wnioskuję o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.

Anno Trusek