

Łódź, dn. 25.06.2024 r.

Dr hab. inż. Dorota Bociąga, prof. Politechniki Łódzkiej
Zakład Inżynierii Biomedycznej i Materiałów Funkcjonalnych
Instytut Inżynierii Materiałowej
Wydział Mechaniczny Politechniki Łódzkiej
ul. Stefanowskiego 1/15, 90-537 Łódź, Polska

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgra Tomasza Szymańskiego

pt. „Zastosowanie nanotechnologii w inżynierii tkanki chrzęstnej”

Promotor: Prof. dr hab. inż. Jakub D. Rybka

Promotor pomocniczy: dr Adam A. Mieloch

Niniejsza recenzja została wykonana na podstawie pisma Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Materiałowa Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

1. UWAGI OGÓLNE O TEMATYCE ROZPRAWY

1.1. Znaczenie problematyki podjętej w recenzowanej rozprawie

Recenzowana rozprawa doktorska pt. „Zastosowanie nanotechnologii w inżynierii tkanki chrzęstnej” dotyczy badań nad możliwością wykorzystania wielościennych nanorurek węglowych (z ang. multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs)), jako materiału, który daje możliwości leczenia uszkodzeń tkanki chrzęstnej, co wciąż stanowi znaczący problem dla współczesnej medycyny.

Biorąc pod uwagę, że główną funkcją tkanki chrzęstnej jest przenoszenie dużych obciążeń podczas ruchu, jest ona podatna na urazy. Słabe unaczynienie, które ogranicza napływ komórek, składników odżywczych i czynników wzrostu, jest główną przyczyną słabej regeneracji w przypadku wystąpienia uszkodzeń. Jak słusznie wskazuje Doktorant, do tej pory nie ma metod leczenia, które zapewniałyby długoterminową, satysfakcjonującą poprawę jakości życia pacjenta. Istniejące metody, to leczenie objawowe z wykorzystaniem wstrzyknięć kwasu hialuronowego, eksperymentalne wstrzyknięcia osocza bogatopłytkowego (PRP) lub innych czynników wzrostu oraz kombinacje komórek macierzystych, których celem jest zwiększenie samoregeneracji. Najbardziej znaną metodą leczenia, będącą jednocześnie najbardziej radykalną interwencją, jest zastosowanie implantu.

Technika biodrukowania 3D, choć nie jest wcale technologią nową, nie ma jeszcze sukcesów w postaci tkanek czy narządów możliwych do bezpośredniej aplikacji medycznej. W przypadku chęci wskazania jej do leczenia tkanki chrzęstnej ma ograniczenie w postaci wytrzymałości mechanicznej konstruktów, które można uzyskać z jej zastosowaniem. Biodruk bezpośredni 3D opiera się bowiem na precyzyjnej ekstruzji biotuszu, składającego się ze składników strukturalnych i żywych komórek. Daje to możliwość wprowadzenia do drukowanej geometrii pożądanego materiału biologicznego w postaci konkretnej linii komórkowej oraz składników, którymi można je stymulować do namnażania, takimi jak czynniki wzrostu. Można zatem odtworzyć mikrośrodowisko rodzimej tkanki, przy użyciu komórek pacjenta i wspomagać wzrost a tym samym regenerację uszkodzonej tkanki. Jednak proces ekstruzji, w którym pojawia się wysokie ciśnienie chwilowe zależne od lepkości biotuszu (a ta od zastosowanego składu) oraz obecność żywych komórek w tymże biotuszu, narzucają również pewne ograniczenia zarówno technologiczne, jak i w zakresie składu.

Głównym wyzwaniem w rozwoju biotuszu do rekonstrukcji chrząstki jest zatem zapewnienie wystarczających właściwości mechanicznych przy jednoczesnym zachowaniu możliwości drukowania i przeżycia komórek. Ponieważ składniki hydrożelu, powszechnie stosowane jako baza dla biotuszu, mają znikomą wytrzymałość mechaniczną, istnieje potrzeba ich fizycznego wzmocnienia. W recenzowanej rozprawie Doktorant zdecydował się na podjęcie próby wykorzystania nanorurek węglowych, aby uzyskać odpowiednie właściwości mechaniczne. W ocenie recenzentki zasługuje to na szczególne uznanie, bo o ile właściwości fizyczne i mechaniczne samych nanorurek węglowych (CNTs) są dość dobrze poznane i nie ma

co do tego wątpliwości, o tyle możliwości ich zastosowania w aplikacjach medycznych wciąż budzą wątpliwości i kontrowersje. Bardzo słusznie Doktorant wskazuje na fakt, że jednym z ważnych aspektów dotyczących wykorzystania wielościennych nanorurek węglowych (z ang. multi-walls carbon nanotubes, MWCNTs) w bioinżynierii jest ich toksyczność. Literatura naukowa obejmuje ten temat, ale opiera się głównie na eksperymentach *in vitro*, z niewielką liczbą eksperymentów w modelu *in vivo*, prezentowane wyniki są sprzeczne i trudno na ich podstawie jednoznacznie powiedzieć o charakterze działania CNTs na organizmy żywe.

Dane przedstawione w rozprawie pokazują, że dodanie MWCNT do rusztowań uzyskiwanych metodą biodruku 3D mogą wzmacniać proliferację komórkową i stymulować różnicowanie komórek macierzystych mezenchymalnych do linii chrzęstnej. Zaprezentowane wyniki stanowią solidną podstawę do dalszych modyfikacji rusztowań innymi dodatkami, które pozwolą na zwiększenie wytrzymałości mechanicznej.

1.2. Cel rozprawy

W niniejszej rozprawie doktorskiej Doktorant wskazuje, iż nanorurki węglowe należą do nanomateriałów posiadających doskonałe właściwości mechaniczne i mogących służyć jako wzmocnienie struktury biodruku. Mając na uwadze, że głównym wyzwaniem tej technologii w zakresie tkanki chrzęstnej jest uzyskanie odpowiedniej wytrzymałości, która będzie w stanie wytrzymać siły działające w stawach, Doktorant sformułował cel swoich badań.

Celem rozprawy doktorskiej mgra inż. Tomasza Szymańskiego było zbadanie możliwości wykorzystania wielościennych nanorurek węglowych (MWCNT) w inżynierii tkanki chrzęstnej.

W celu realizacji powyższej przytoczonego celu pracy, mgr inż. Tomasz Szymański realizował prace badawcze polegające na: 1) ocenie testów użytych do określenia wpływu wielościennych nanorurek węglowych na komórki 2) ocenie wpływu wielościennych nanorurek węglowych na metabolizm komórek i właściwości mechaniczne rusztowań biodrukowanych w 3D.

2. FORMALNA STRONA ROZPRAWY

2.1. Struktura rozprawy i wykorzystana literatura

Pracę stanowi zbiór trzech publikacji wskazanych przez Doktoranta na samym początku rozprawy i określonych jako „Wykaz prac naukowych włączonych do osiągnięcia naukowego”. Są nimi następujące pozycje:

1. Szymański T., Mieloch A.A., Richter M., Trzeciak T., Florek E., Rybka J.D., Giersig M., Utilization of Carbon Nanotubes in Manufacturing of 3D Cartilage and Bone Scaffolds in orthopedics, *Materials* 2020, 13(18), 4039;
2. Szymański T., Kempa M., Giersig M., Rybka J.D Carbon Nanotubes Interference with Luminescence-Based Assays *Materials* 2020;13(19):4270;
3. Szymański T., Semba J.A., Mieloch A.A., Cywoniuk P., Kempa M., and Rybka J.D. Hyaluronic acid and multiwalled carbon nanotubes as bioink additives for cartilage tissue engineering *Sci Rep* 13 (646); 2023.

Całość opracowania napisana jest w języku angielskim. Wskazane powyżej artykuły stanowią trzon rozprawy a poprzedzone są streszczeniem w języku polskim oraz angielskim, zapisem celu pracy oraz wstępem stanowiącym dwuipółstronicowe podsumowanie badań prezentowanych jako dorobek naukowy wpisujący się w niniejszą rozprawę. Na kolejnych 10 stronach Doktorant zawarł swoisty przewodnik po wykonanych badaniach opisanych w publikacjach oraz odniósł się do innych realizowanych przez niego zagadnień badawczych mniej lub bardziej związanych z tematyką pracy. Ostatnie dwie strony stanowi podsumowanie i perspektywy na przyszłość. Ta część pracy zakończona jest wykazem literatury, którą Doktorant przywołuje w części pracy stanowiącej wstęp i „przewodnik” po publikacjach i prowadzonych badaniach.

Prace wskazane jako wpisujące się do osiągnięcia naukowego przytoczone są w wersji oryginałów, zakończone oświadczeniami o udziałach poszczególnych współautorów, co do zakresu prac, za jakie byli odpowiedzialni. W każdej z tych prac mgr Tomasz Szymański jest pierwszym autorem. Każdorazowo wskazany jest dokładnie zakres prac, za które odpowiedzialny był Doktorant, jednak dobrze by było, gdyby udziały te zostały określone również procentowo.

Zdecydowana większość cytowanej w pracy literatury pochodzi z ostatniego dziesięciolecia i są to głównie publikacje ze znaczących czasopism naukowych o zasięgu międzynarodowym. Literatura przytoczona do opisu stanowiącego przewodnik-podsumowanie liczy 42 pozycje. Publikacje zostały dobrane trafnie i poprawnie przypisane względem omawianych zagadnień.

2.2. Język i formalna strona rozprawy

Praca stosuje się do podstawowych zasad typografii. Zawiera 7 rysunków nie licząc tych, które są przytoczone w oryginałach publikacji składających się na osiągnięcie naukowe – te mają swoją każdorazowo niezależną numerację stron, rysunków, tabel i odnośników literaturowych. Język pracy jest właściwy dla opracowań naukowych. Edycja trzech wskazanych publikacji, ich poprawność językowa i zakres, nie podlegają ocenie z racji faktu, że są to pozycje opublikowane w recenzowanych czasopismach.

3. OCENA MERYTORYCZNA

Analizę literatury stanowi publikacja przeglądowa pt. *Utilization of Carbon Nanotubes in Manufacturing of 3D Cartilage and Bone Scaffolds in orthopedics*, która w pełni uzasadnia wybór tematyki pracy i stanowi solidną podstawę do sformułowania celu rozprawy. Przedstawia ona wyniki badań nad możliwościami wykorzystania MWCNTs w inżynierii tkankowej wskazując na istotne problemy analityczne w prowadzonych dwuwymiarowych hodowlach komórkowych, gdzie nanomateriały mogą zakłócać wyniki uzyskiwane poprzez zastosowanie wiele dobrze ugruntowanych technik opartych na absorpcji i fluorescencji, ze względu na ich swoiste właściwości (takie jak np. silna absorpcja optyczna). Z tego powodu toksyczność nanomateriałów w kontekście zastosowań medycznych jest przedmiotem trwającej debaty naukowej, często popartej sprzecznymi danymi. Praca przeglądowa Pana Tomasza Szymańskiego szczegółowo opisuje możliwości wystąpienia niewłaściwej interpretacji wyników mogącej wynikać właśnie ze sposobów prowadzenia badań, które nie uwzględniają specyficznych cech nanomateriałów. Praca ta stanowi bardzo dobrą dyskusję i punkt wyjścia do podjętych przez Doktoranta badań.

Za część eksperymentalną niniejszej rozprawy uznać należy dwie wskazane publikacje, mianowicie „Carbon Nanotubes Interference with Luminescence-Based Assays” oraz „Hyaluronic acid and multiwalled carbon nanotubes as bioink additives for cartilage tissue engineering”. W pierwszej z nich Doktorant bada wykonalność testów opartych na luminescencji w obecności MWCNTs. Ustalając ich wiarygodność określił, że najwyższe stężenie, które nie zakłóca pomiaru, wynosi 0,0625 mg/ml MWCNT, co potwierdził również analizą spektroskopową. W drugiej publikacji mgr Tomasz Szymański przedstawia badanie wpływu MWCNT i kwasu hialuronowego zarówno na dwuwymiarowe hodowle komórkowe, jak i trójwymiarowe biodrukowane rusztowania. Optymalne stężenia dodatków określił w hodowlach 2D z dwiema liniami komórkowymi: natywnymi komórkami tkanki chrzęstnej – chondrocytami stawowymi (NHAC-kn) oraz pochodzącymi z tkanki tłuszczowej ludzkimi komórkami macierzystymi mezenchymalnymi (hMSC-AT). Linie komórkowe wybrano bardzo trafnie a wyniki dla nich porównywano. Prowadzenie badań z wykorzystaniem linii komórek macierzystych hMSC-AT jest bardzo zasadne mając na uwadze cel przyświecający całości prowadzonych badań, czyli możliwości odtwarzania tkanki chrzęstnej. Komórki mezenchymalne można bowiem łatwo uzyskać z tkanki tłuszczowej pacjenta a w drugim kroku wykorzystać je do wytworzenia spersonalizowanego rusztowania chrząstki.

Proces biodrukowania i wzrostu 3D w rusztowaniu Doktorant prowadził na komórkach hMSC-AT stosując określone wcześniej stężenie MWCNT na poziomie 0,0625 mg/ml. Bazę stanowił biotusz składający się z 0,75% alginianu, 4% żelatyny i 1,4% nanokrystalicznych włókien celulozowych (CNCC), rozpuszczonych w 4,6% (w/v) d-mannitolu i dodatkowo uzupełnionych o MWCNT. Biodrukowane konstrukcje hodowano przez 21 dni a żywotność komórek w nich zawartych oceniano za pomocą testu opartego o barwienie fluorescencyjne (LIVE/DEAD). Wyniki pokazały, że dodatek MWCNT w biotuszu ma pozytywny wpływ na

żywołność komórek w czasie, w przeciwieństwie do rusztowań bez MWCNT i do zachowania często opisywanego w literaturze naukowej.

Do tej części rozprawy mam pytania i będę wdzięczna za udzielenie wyjaśnień co do nich.

1) Do testów, prowadzonych w celu zweryfikowania poprawności stosowanych technik analitycznych, wykorzystano modyfikowane MWCNTs o stężeniach 0,0625 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, and 1 mg/mL określając na końcu, że stężenie 0,0625 mg/ml jest najwyższym, jakie można wiarygodnie zastosować w takich analizach.

W kolejnym etapie badań, oceniając minimalne stężenia, które stymulują żywołność komórek i zmniejszają reaktywne formy tlenu oraz poziom apoptozy w dwuwymiarowych hodowlach komórkowych, zastosowano stężenia MWCNTs wynoszące 0,015 mg/mL, 0,03 mg/mL, 0,0625 mg/mL i 0,125 mg/mL. Bardzo proszę o wskazanie, na jakiej podstawie dokonywano wyboru stosowanych stężeń i co wnosili do analiz badania ze stężeniami, które odrzucono w etapie pierwszym, jako te, które nie pozwalają uzyskać wiarygodnych wyników?

2) Jak ma się zastosowane stężenie MWCNTs wynoszące 0,0625 mg/mL w stosunku do pożądanego stężenia w aspekcie pozytywnej odpowiedzi biologicznej – jakie powinno ono być (gdyby nie ograniczenia analityczne) i jak, zdaniem Doktoranta, wpłynęłoby ono na właściwości materiału i możliwość uzyskania materiału do leczenia uszkodzeń tkanki chrzęstnej?

3) Jak, w ocenie Doktoranta, jednorazowe działanie ciśnienia podczas ekstruzji przekłada się na możliwość występowania pozytywnych skutków wpływu na komórki przypisywanym mechanizmom mechanotransdukcji, które odgrywają niebagatelną rolę w naturalnych warunkach, kiedy to komórki obecne w chrząstce są stale poddawane naciskowi?

4) W pracy prowadzono badania na biodrukowanych rusztowaniach składających się z 0,75% alginianu, 4% żelatyny, 1,4% nanokrystalicznych włókien celulozowych (CNCC), rozpuszczonych w 4,6% (w/v) d-mannitolu, które następnie uzupełniane były o dodatkowe składniki w postaci kwasu hialuronowego oraz MWCNT w różnym stężeniu. Co było wskazaniem do ustalenia takiego właśnie składu dla bazowego biotuszu? Jaki wpływ, zdaniem Doktoranta, na zaburzenia pomiarów metodami fluorescencyjnymi oraz spektrofotometrycznymi może mieć fakt, że obecna w układzie żelatyna (sieciująca termicznie) ulega rozsiewaniu podczas hodowli prowadzonej w temperaturze 37°C i zostaje uwolniona do medium hodowlanego pozostając w bezpośrednim kontakcie z komórkami w całej jego objętości?

5) W jakiej postaci biodrukowane były próbki do badań opisanych w publikacji pod pozycją nr 3? W opisie metodyki wskazano, że skany do liczenia żywołności pobrano z bocznej części trzech różnych konstrukcji w każdym punkcie czasowym a z każdego z tych skanów wybrano

dwa środkowe plasterki do liczenia żywych i martwych komórek. Jestem bardzo ciekawa, jak te próbki wyglądały. Czy ich kształt przy danej przepuszczalności biotuszu dla medium hodowlanego pozwolił na równomierne odżywianie komórek? Na ile wówczas przekroje poprzeczne są reprezentatywną próbą do tych obliczeń?

6) Doktorant pisze, że pomimo wprowadzenia MWCNT parametry mechaniczne nie wzrosły znacząco, jednak biotusz zachował dobrą drukowalność, ponieważ naprężenie ścinające i lepkość jako funkcja szybkości ścinania nie uległy znaczącej zmianie. W prezentowanych pracach brak testów mechanicznych dla analizowanych materiałów. Proszę o słowo komentarza, jak mają się zatem wyniki badań reologicznych do osiągnięcia założenia wzmocnienia mechanicznego biowydruków hydrożelowych z komórkami do leczenia ubytków tkanki chrzęstnej, dla której wymagania wytrzymałości mechanicznej są znacząco wyższe aniżeli parametry hydrożeli?

Podsumowując powyższą część recenzji, stwierdzam, że uwagi i pytania w niej zawarte wynikają z ciekawości natury naukowej i w żaden sposób nie wpływają na bardzo pozytywną ocenę rozprawy jako całości.

4. OCENA ROZPRAWY I WNIOSKI KOŃCOWE

Doktorant w sposób jednoznaczny określił problem badawczy, poprawnie dobrał techniki analityczne i sformułował zadania naukowe, które następnie rozwiązał. Kompleksowe podejście, jakie przedstawił Doktorant, **świadczy o jego dojrzałości badawczej i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej**. Przedstawiona rozprawa wykazuje, że **Doktorant dysponuje ogólną wiedzą teoretyczną i dorobkiem** o charakterze podstawowym w dyscyplinie inżynieria materiałowa.

Praca doktorska Pana mgra Tomasza Szymańskiego pt. „Zastosowanie nanotechnologii w inżynierii tkanki chrzęstnej” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Przedstawia ciekawe i bardzo aktualne opracowanie dotyczące badań nad możliwością wykorzystania wielościennych nanorurek węglowych jako materiału, który daje możliwości leczenia uszkodzeń tkanki chrzęstnej. Wykorzystując szeroki wachlarz technik eksperymentalnych, Doktorant ocenił wpływ MWCNT na komórki w hodowli 2D, a także na stan komórek w konstrukcjach biodrukowanych 3D.

Całość pracy została zredagowana bardzo przejrzysto, jest napisana językiem czytelnym i zwięzłym, z zachowaniem fachowej nomenklatury a jednocześnie bardzo zrozumiale. Sformułowane przeze mnie uwagi i pytania w żadnym stopniu nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny merytorycznej recenzowanej pracy. Tym bardziej, że szeroki jest wachlarz zastosowanych metod, które zrealizowano w taki sposób, że wyniki badań uzupełniają się i stanowią opracowanie, które w istotny sposób może wpłynąć na możliwości

wytwarzania materiałów przydatnych w inżynierii tkankowej jako zamiennik uszkodzonej chrząstki. Dodatkowo na uznanie zasługuje odwaga badawcza, jaką wykazał się Doktorant podejmując temat i stosując materiał w postaci MWCNT, odnośnie do którego już od lat trwa polemika, co do jego przydatności w aplikacjach biomedycznych.

Stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji **rozprawa doktorska pt. „Zastosowanie nanotechnologii w inżynierii tkanki chrzęstnej” mgra Tomasza Szymańskiego** spełnia wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) oraz **mieści się w dyscyplinie naukowej inżynieria materiałowa**. Biorąc powyższe pod uwagę **stawiam wniosek o dopuszczenie rozprawy doktorskiej mgr Tomasza Szymańskiego do publicznej obrony**.

Całość wyводу naukowego, jak i jakość oraz zakres badań przeprowadzonych przez Doktoranta są unikatowe i niosą za sobą duży potencjał aplikacyjny. Ponadto, biorąc pod uwagę istotność podjętego tematu, jego interdyscyplinarność, zastosowane metody badawcze, oryginalny i nowatorski charakter, wkład w rozwój dyscypliny inżynieria materiałowa, oraz bardzo staranną formę edycyjną recenzowanej rozprawy **wnoszę o jej wyróżnienie**.

Donata Boušpa