



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA  
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki  
**KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I KOMPOZYTÓW**

Prof. dr hab. inż. Elżbieta PAMUŁA  
Prodziekan ds. Nauki WIMiC

Kraków, 20 maja 2024

#### RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Tomasza Szymańskiego  
pt. "*Application of nanomaterials in cartilage tissue engineering*"  
zrealizowanej pod kierunkiem  
Promotora dr. hab. inż. Jakuba D. Rybki, Prof. UAM  
i Promotora pomocniczego dr. Adama A. Mielocha

Recenzja została opracowana na podstawie uchwały  
Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Materiałowa UAM  
z dnia 12 marca 2024 i zlecenia Przewodniczącego Rady Naukowej  
Dyscypliny Inżynieria Materiałowa  
Prof. dr. hab. Michała Banaszaka z dnia 20 marca 2024

Uszkodzenia i zwyrodnienia chrząstki stawowej stanowią poważny problem kliniczny i dotyczą bardzo dużego odsetka osób, szczególnie w starszym wieku. Niestety możliwości leczenia tych schorzeń są ograniczone z uwagi na bardzo niską zdolność chrząstki do samoistnej regeneracji. Ostatnimi laty duże nadzieje pokłada się w inżynierii tkanki chrzęstnej opierającej się wykorzystaniu technologii druku 3D z użyciem biotuszy, w których zawieszają się chondrocyty lub mezenchymalne komórki macierzyste, z nadzieją że sygnały przesyłane przez te sztuczne matryce zewnątrzkomórkowe skłonią komórki do różnicowania chondrogenego i w konsekwencji do wyleczenia pacjenta. Badania prowadzone przez pana mgr. Tomasza Szymańskiego skupiające się na opracowaniu biotuszy wzbogaconych w nanorurki węglowe, bardzo dobrze wpisują się w ten obszar badawczy i stanowią odpowiedź na zapotrzebowanie środowiska medycznego. Dlatego uważam, że wybór tematyki rozprawy doktorskiej jest nowatorski, trafny i właściwie uzasadniony.



WIMiC

Akademia Górniczo-Hutnicza | Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki  
Katedra Biomateriałów i Kompozytów

al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, tel. +48 12 617 44 48, fax. +48 12 617 33 71  
e-mail: epamula@agh.edu.pl, www.ceramika.agh.edu.pl  
Regon: 000001577, NIP: 675 000 19 23

Rozprawa doktorska pana mgr. Tomasza Szymańskiego została zredagowana w języku angielskim i opiera się na trzech artykułach opublikowanych w latach 2020 i 2023 w czasopiśmie z bazy JCR, przy czym dwie prace wydano w czasopiśmie *Materials* i jedną w *Scientific Reports*. Na początku dysertacji autor umieścił listę trzech publikacji będących podstawą do uzyskania stopnia doktora, następnie przedstawił swój życiorys naukowy i listę wszystkich publikacji wraz z danymi bibliometrycznymi. Dalej znajduje się abstrakt i streszczenie w języku polskim, co oznacza, że został w tym względzie spełniony wymóg ustawy. Kolejno na 10 stronach umieszczony został cel pracy, wprowadzenie literaturowe przygotowane na podstawie pierwszej pracy przeglądowej doktoranta i pokrótce opisane zostały wyniki zawarte w dwóch pracach eksperymentalnych wchodzących w skład cyklu publikacji. Dalej na 6 stronach autor umieścił informację na temat prowadzonych dotychczas przez niego innych badań, oraz podsumował najważniejsze osiągnięcia jego pracy doktorskiej i dalsze plany badawcze. Część wstępną kończy spis 42 pozycji literaturowych.

Następnie dołączono trzy prace stanowiące cykl publikacji oraz oświadczenia o udziale w ich powstaniu. Doktorant w każdej z nich był pierwszym autorem. Na podstawie załączonych oświadczeń doktoranta i pozostałych współautorów można stwierdzić, że udział doktoranta w ich powstaniu był dominujący i obejmował: opracowanie koncepcji artykułów, analizę literatury, przygotowanie próbek, wykonanie większości eksperymentów i testów analitycznych, przygotowanie rysunków oraz manuskryptów.

Nadrzędnym celem pracy doktorskiej kandydata było wykazanie, że dodatek wielościennych nanorurek węglowych do biotuszy wpłynie korzystnie na ich właściwości w kontekście ich wykorzystania w inżynierii tkanki chrzęstnej. Szczególny nacisk doktorant położył na poprawę właściwości mechanicznych i reologicznych biotuszy oraz ich wpływ na żywotność i różnicowanie chondrogenne komórek.

W pierwszej pracy – przeglądowej pt. *Utilization of carbon nanotubes in manufacturing of 3D cartilage and carbon scaffolds in orthopaedics (Materials 2020, 13(8), 4039)* kandydat to stopnia doktora opisał budowę chrząstki stawowej pod względem jej składu, mikrostruktury i właściwości mechanicznych a także przedstawił metody leczenia ubytków chrzęstnych i osteochondralnych. Następnie przeszedł do opisu nanorurek węglowych z uwzględnieniem ich rodzajów i zachowania w środowisku biologicznym, podkreślając tym samym ich doskonały potencjał w zakresie poprawy właściwości mechanicznych kompozytów a także kształtowania odpowiedzi komórkowej. Dalej przedstawił metody otrzymywania rusztowań dla inżynierii tkanki kostnej i chrzęstnej, kładąc szczególny nacisk na metody przyrostowe a w szczególności biodruk. Podsumowując najnowsze doniesienia naukowe stwierdził, że nanorurki węglowe dzięki swojej budowie nanostrukturalnej przypominającej włókna kolagenowe, z jednej strony powinny poprawić parametry mechaniczne biotuszy, a z drugiej zapewniać odpowiednie biomimetyczne mikrośrodowisko dla komórek. Podkreślić należy, że artykuł ten został zauważony przez środowisko naukowe, o czym świadczą duża liczba cytowań, bo aż 29.

Praca przeglądowa, która powstała na podstawie 147 publikacji, była dobrym punktem wyjścia do przeprowadzenia przez doktoranta badań eksperymentalnych, opisanych w dwóch kolejnych artykułach.

W artykule drugim pt. *Carbon nanotubes interference with luminescence-based assays (Materials 2020, 13(19), 4270)* doktorant postanowił wyjaśnić dlaczego w literaturze jest tak dużo rozbieżności w odnośnie cytotoksyczności nanorurek węglowych: jedni badacze uważają, że są one cytotoksyczne a inni, że nie wykazują symptomów cytotoksyczności. Pan mgr Tomasz Szymański stwierdził, że może to wynikać oddziaływań nanorurek z substratami bądź produktami reakcji wykorzystywanymi w testach biologicznych, co np. ostatnio stwierdzono w przypadku testów opierających się na pomiarach absorbancji czy fluorescencji. Dlatego też doktorant

zaprojektował systematyczne badania cytotoksyczności wielościennych nanorurek węglowych na chondrocytach ludzkich z wykorzystaniem różnych testów bazujących na zjawisku luminescencji. Badania jego wykazały, że obecność nanorurek obniża sygnał luminescencji tym bardziej im większa ich ilość jest dodana do badanego układu. Zaleca więc stosowanie materiałów kontrolnych pozytywnych i negatywnych, aby wyniki były wiarygodne oraz ostrożne podejście do wyników już opublikowanych prac.

W artykule 3 pt. *Hyaluronic acid and multiwalled carbon nanotubes as bioink additives for cartilage tissue engineering (Scientific Reports, 2023, 13, 646)* doktorant oceniał wpływ dodatków w postaci kwasu hialuronowego i wielościennych nanorurek węglowych na żywotność i proliferację chondrocytów oraz różnicowanie chondrogenne mezenchymalnych komórek macierzystych wyizolowanych z tkanki tłuszczowej. Ponadto badał wpływ tych dodatków na stabilność i właściwości reologiczne biotuszu o składzie 0,75% alginianu sodu, 4% żelatyny i 1,4% nanowłókien celulozy. Wykazał, że dodatek nanorurek węglowych wpływał korzystnie na żywotność komórek, co przypisał ich biomimetycznej budowie w odniesieniu do włókien kolagenowych. Stwierdził też obniżenie poziomu ekspresji genów markerowych różnicowania chondrogenego, co wskazuje, że skład biotuszu powinien być w przyszłości zoptymalizowany.

Studiując tę część dysertacji nasunęło mi się pytanie dotyczące wyników żywotności chondrocytów przedstawionych na *Figure 1 a, b*. Dlaczego dla próbki kontrolnej (Control) wyniki przedstawione na *Figure 1 a* są inne niż na *Figure 1 b*? Czy dla próbek poddawanych działaniu HA i nanorurek były używane różne próbki jako materiały kontrolne? Drugie pytanie dotyczy *Figure 2 a, b, c*. Jak należy rozumieć opisy osi rzędnych? Co oznacza „%relative to control” skoro na osiach są wartości od 0 do  $1 \times 10^6$  (*Figure 2 a*), od 0 do  $8 \times 10^5$  (*Figure 2 b*), od 0 do  $3 \times 10^4$  (*Figure 2 c*). Czy wykres przedstawiony na *Figure 1 d* dotyczący aktywności kaspazy 3/7 dla badań na chondrocytach nie jest identyczny jak wykres przedstawiony na

Figure 2 d przypisany wynikom badań na mezenchymalnych komórkach macierzystych?

Chciałabym też zaprosić doktoranta już w czasie obrony pracy doktorskiej do dyskusji odnośnie przyszłości biodruku. Jakie są jego zalety i ograniczenia? Czy zdaniem doktoranta będzie on techniką powszechną, a jeśli tak, to w jakim przedziale czasowym?

Chciałabym podkreślić, że dysertacja doktorska pana mgr. Tomasza Szymańskiego pt. "*Application of nanomaterials in cartilage tissue engineering*" spełnia kryteria stawiane kandydatom do stopnia doktora w dyscyplinie inżynieria materiałowa opisane w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn.zm.). Dlatego wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej oraz dopuszczenie pana mgr. Tomasza Szymańskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Ponadto uważam, że pracę doktorską cechuje bardzo wysoki poziom naukowy, o czym świadczą: 1) wykorzystanie nowatorskich technik wytwarzania i modyfikacji biotuszy poprzez dodatek nanorurek węglowych, które nadają im dodatkową funkcjonalność, 2) wykorzystanie zaawansowanych technik badawczych, szczególnie w zakresie badań różnicowania komórek 3) klarowne przedstawienie i dyskusja wyników, oraz 4) wyciąganie wniosków mających solidne poparcie w danych eksperymentalnych. Na podkreślenie zasługuje też, że artykuły stanowiące cykl publikacji zostały opublikowane, co oznacza, że już przeszły wnikliwy proces recenzji, a cytowania świadczą, że zdobyły one uznanie środowiska naukowego. Kandydat do stopnia doktora jest współautorem w sumie 6 publikacji w czasopiśmie z bazy JCR. Ponadto prowadził badania w wielu ośrodkach w ramach projektów finansowanych przez NCN i NCBiR oraz przebywał na stażu zagranicznym. Dlatego uważam, że wykazuje się wyróżniającą aktywnością naukową i może pochwalić się bardzo dobrym dorobkiem, jak na ten etap rozwoju naukowego. Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że praca doktorska pana mgr. Tomasza Szymańskiego zasługuje na wyróżnienie.

E. Pęczak