



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Katedra Urologii i Andrologii
Zakład Medycyny Regeneracyjnej, Bank Komórek i Tkanek

Wytwórnia ATMP

Prof. dr hab. n. med. Marta Pokrywczyńska
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz
tel./fax. +48 52 585 60 80
e-mail: zmr@cm.umk.pl

Bydgoszcz, 01.12.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
pt. „Zastosowanie biodruku 3D oraz opracowanie biotuszy na bazie hydrożeli i nanomateriałów
dla inżynierii tkankowej łąkotki”
autorstwa mgr Julii Anny Semby
realizowanej pod kierunkiem
prof. UAM dr hab. inż. Jakuba. D Rybki- promotora pracy
dr. Adama A. Mielocha- promotora pomocniczego

Przedmiotem rozprawy doktorskiej było opracowanie biotuszu dla ekstruzyjnego biodruku 3D implantów łąkotki oraz wzbogacenie go nanorurkami węglowymi i kwasem hialuronowym w celu poprawienia właściwości mechanicznych i biologicznych.

Biodruk 3D to innowacyjna technika inżynierii tkankowej pozwalająca na tworzenie trójwymiarowych konstruktów odwzorowujących strukturę tkanki. Metoda ta pozwala na tworzenie spersonalizowanych implantów, które mogą w przyszłości znaleźć szerokie zastosowanie w medycynie regeneracyjnej. Jednym z największych wyzwań biodruku 3D jest opracowanie optymalnych biotuszy przeznaczonych do odtworzenia poszczególnych typów tkanek pozwalających na odwzorowanie naturalnej mikromacierzy zewnątrzkomórkowej tkanki przy zachowaniu parametrów reologicznych umożliwiających biodruk. Mając na względzie powyższe należy z całą mocą podkreślić, że tematyka rozprawy doktorskiej mgr Julii Anny Semby dotyczy bardzo ważnego zagadnienia o wielorakim znaczeniu poznawczym i praktycznym.

Rozprawa doktorska ma formę cyklu powiązanych tematycznie artykułów uzupełnionych wprowadzeniem i podsumowaniem, a także streszczeniami w języku polskim i angielskim i oświadczeniami współtwórców publikacji tworzących cykl. W skład cyklu wchodzi 5 artykułów opublikowanych w latach 2020-2023, w tym trzy prace oryginalne i dwie przeglądowe oraz 2 nieopublikowane (wysłane do recenzji) oryginalne manuskrypty:

Publikacja 1. Semba JA, Mieloch AA, Rybka JD. Introduction to the state-of-the-art 3D bioprinting methods, design, and applications in orthopedics. *Bioprinting* 18;2020, e00070.

Publikacja 2. Olejnik A, Semba JA, Kulpa A, Dańczak-Pazdrowska A, Rybka JD, Gornowicz-Porowska J 3D Bioprinting in Skin Related Research: Recent Achievements and Application Perspectives. *ACS Synth Biol.* 2022; 11: 26-38

Publikacja 3. Mieloch AA, Semba JA, Rybka JD. CNT-Type Dependent Cellular Adhesion on 3D-Printed Nanocomposite for Tissue Engineering. *Int J Bioprint.* 2022; 8: 548.

Publikacja 4. Semba JA, Mieloch AA, Tomaszewska E, Cywoniuk P, Rybka JD. Formulation and evaluation of a bioink composed of alginate, gelatin, and nanocellulose for meniscal tissue engineering. *Int J Bioprint.* 2022; 9:621.



Publikacja 5. Szymański T, Semba JA, Mieloch AA, Cywoniuk P, Kempa M, Rybka JD. Hyaluronic acid and multiwalled carbon nanotubes as bioink additives for cartilage tissue engineering. *Sci Rep.* 2023; 13: 646.

Publikacja 6. Semba JA, Mieloch AA, Teixeira AM, Martins P, Rybka JD. Mechanical testing of 3D printed constructs for meniscal tissue engineering, unpublished data.

Publikacja 7. Mankowska M, Stefańska M, Mleczo AM, Kot W, Krych Ł, Semba JA, Rybka JD. Single cell transcriptomic atlas of porcine meniscus: paving the way for advanced therapies, unpublished data.

Publikacje 1 i 2 to publikacje przeglądowe stanowiące wstęp teoretyczny do całego cyklu. W publikacji 1 w niezwykle czytelny sposób przedstawiono podstawowe zagadnienia dotyczące biodruku i jego zastosowania w inżynierii tkankowej chrząstki i kości. W publikacji 2 scharakteryzowano i opisano zastosowanie wybranych biotuszy w biodruku 3D. Prace te pokazują, iż Doktorantka wykazuje się ogromną znajomością przedmiotu dysertacji i swobodnie porusza się w badanej tematyce.

W publikacji 3 podjęto próbę opracowania nowego tuszu do druku 3D bazującego na polikaprolaktonie (ang. polycaprolactone, PCL) i nanorurkach węglowych. Oceniono wpływ dodatku wielościennych nanorurek węglowych (ang. multiwalled carbon nanotubes, MWCNT) i nanorurek węglowych o strukturze bambusa (ang. bamboo-like carbon nanotubes, BCNT) na właściwości fizykochemiczne, mechaniczne i biologiczne PCL. Co ciekawe badanie ujawniło, że dodanie nanorurek węglowych nie wpływa znacząco na właściwości mechaniczne, ale może mieć istotne znaczenie dla poprawy właściwości biologicznych PCL. Wykazano, że wzbogacenie PCL niskimi stężeniami nanorurek węglowych BCNT (0,01-0,05% zwłaszcza 0,02%) wpływa korzystnie na adhezję, proliferację i utrzymanie prawidłowej morfologii ludzkich chondrocytów *in vitro*. Zastosowane w odpowiednich stężeniach nanorurki węglowe BCNT i MWCNT (0,01-0,05%) nie wpływają negatywnie na właściwości biologiczne PCL- kompozyty PCL i nanorurek węglowych nie są cytotoksyczne *in vitro*. Praca ta dowiodła, że PCL wzbogacony nanorurkami węglowymi BCNT jest obiecującym nowym materiałem, który może znaleźć zastosowanie w druku 3D i inżynierii tkankowej.

W publikacji 4 opracowano metodę wytwarzania nowego biotuszu z alginianu, żelatyny i nanocelulozy do biodruku 3D łąkotki. Wykazano, że opracowany biotusz jest drukowalny, stabilny w warunkach *in vitro* i nie jest cytotoksyczny wobec ludzkich chondrocytów *in vitro*. Co niezwykle istotne, żywotność ludzkich chondrocytów w biodruku wynosiła >98%. Problemem, który doskonale dostrzega Doktorantka jest brak proliferacji chondrocytów enkapsulowanych w biotuszu i spadek ekspresji wybranych markerów chondrocytów w 28 dniu hodowli. Otrzymane wyniki mogą być podstawą do dalszych badań nad opracowaniem biotuszu do biodruku 3D łąkotki.

W publikacji 5 opracowany we wcześniejszych badaniach biotusz na bazie alginianu, żelatyny i nanocelulozy wzbogacono wielościennymi nanorurkami węglowymi i kwasem hialuronowym (ang. hyaluronic acid, HA). Dobór stężeń MWCNT oraz HA zoptymalizowano na podstawie badań *in vitro* w hodowlach 2D chondrocytów ludzkich. Biotusz wykorzystano w biodruku 3D w połączeniu z ludzkimi mezenchymalnymi komórkami zrębowymi tkanki tłuszczowej (ang. Adipose Derived-Mesenchymal Stromal Cells, AD-MSCs). Wykazano, że dodatnie MWCNT i HA do biotuszu na bazie



alginianu, żelatyny i nanocelulozy wpływa korzystnie na żywotność komórek AD-MSCs w konstrukcjach 3D. Wzbogacenie biotuszu na bazie alginianu, żelatyny, nanocelulozy kwasem hialuronowym wpływa negatywnie na stabilność konstrukcji, ale co interesujące efekt ten niweluje dodanie nanorurek węglowych. Pomimo obiecujących wyników modyfikacji obserwowano spadek ekspresji markerów chondrogenyzy w komórkach AD-MSCs enkapsulowanych w biotuszach z dodatkiem HA, MWCNT oraz HA+MWCNT w porównaniu do biotuszu bez dodatków.

Wyniki publikacji 4 i 5 wskazują na konieczność dalszych badań mających na celu utrzymanie fenotypu chondrocytów, czy poddanych różnicowaniu chondrogenemu komórek MSCs enkapsulowanych w biodrukowanych 3D konstrukcjach.

Prace 6 i 7 to nieopublikowane manuskrypty. Praca 6 jest uzupełnieniem wcześniejszych badań w kierunku opracowania nowego biotuszu do biodruku 3 D łątki o analizie mechanicznej. Badanie potwierdziło, że wzbogacenie biotuszu na bazie alginianu, żelatyny i nanocelulozy wielościennymi nanorurkami węglowymi poprawia właściwości mechaniczne konstrukcji. Co godne uznania analizy wytrzymałościowe wykonano z wykorzystaniem stworzonego do tego celu sprzętu przystosowanego do testowania kompresji biodruków 3D na bazie hydrożeli, badanie wykonano w czasie stażu naukowego na Uniwersytecie Porto.

W ostatniej 7 pracy podjęto próbę identyfikacji markerów subpopulacji komórkowych natywnej łątki, które mogą znaleźć zastosowanie w ocenie różnicowania komórkowego w biodrukowanych konstrukcjach 3D łątki. Po raz pierwszy sekwencjonowaniu RNA na poziomie pojedynczej komórki (scRNA-seq) poddano poszczególne strefy łątki: białą w strefie białej i czerwoną w strefie czerwonej. Wykazano, że najliczniejszą populację stanowiły chondrocyty, wśród których wyróżnić można było 5 subpopulacji o odmiennej ekspresji genów odpowiadające różnym poziomom zróżnicowania komórkowego. Praca ta dowodzi niezwykle szerokiego, kompleksowego podejścia Zespołu do tematyki będącej przedmiotem badań.

Uzupełnieniem cyklu publikacji są wyniki badań dodatkowych dotyczących wpływu kolagenu rybiego na ekspresję genów różnicowania chondrogenego w komórkach AD-MSCs enkapsulowanych w biodrukowanych 3D konstrukcjach.

Pięć spośród siedmiu prac tworzących cykl opublikowano w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Łączny IF czasopisma, w których opublikowano prace stanowiące rozprawę doktorską wynosi 25,09. Artykuły przeglądowe 1 i 2 były cytowane jak dotąd odpowiednio 44 i 18 razy (Scopus). Mniejsza liczba cytowań pozostałych trzech prac doświadczalnych (3-4 cytacje/pracę) wynika z niedługiej daty publikacji (2022-2023). Uważam, że zarówno opublikowanie powyższych prac w renomowanych czasopiśmie jak i ich rozpoznawalność w środowisku naukowym stanowią niezależne potwierdzenie ich znaczenia jak i wysokiej wartości merytorycznej.

Istotnym elementem recenzji rozprawy doktorskiej opartej w współautorski cykl publikacji jest ocena indywidualnego wkładu Doktorantki w publikacje stanowiące rozprawę, którą można przeprowadzić na podstawie oświadczeń współautorów. W 6 z 7 prac stanowiących cykl Doktorantka była pierwszym (3 prace) lub drugim autorem (3 prace) co wskazuje na Jej wiodącą rolę w przedstawionych badaniach. W przypadku trzech publikacji oryginalnych- prace 4,5,6, których przedmiotem było opracowanie i analiza nowego biotuszu do biodruku 3D Doktorantka



wykonała podstawową część badań (zaprojektowała badanie, opracowała skład biotuszu, wydrukowała 3D konstrukty, oceniła właściwości mechaniczne i biologiczne konstruktów, opracowała i zinterpretowała wyniki) decydującą o oryginalności i wartości tych publikacji. Po analizie oświadczeń współautorów uznaję, że indywidualny wkład Doktorantki w powstanie publikacji oryginalnych 4 i 6 stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej jest przeważający.

Zadaniem recenzenta rozprawy doktorskiej opartej o cykl publikacji nie jest ponowne recenzowanie prac. Rozprawa doktorska składająca się z 7 publikacji zasługuje na pełne uznanie. Docenić należy innowacyjne i kompleksowe podejście metodyczne wykorzystywane w doświadczeniach, których efektem jest opracowanie nowych biotuszy do biodruku 3D, które mogą znaleźć w przyszłości zastosowanie w inżynierii tkankowej łąkotki.

Rozdziały stanowiące omówienie cyklu są bardzo czytelne i poprawne bez dostrzegalnych błędów merytorycznych czy językowych. Z obowiązku recenzenta muszę zgłosić drobne uwagi, które w najmniejszym stopniu nie umniejszają wartości pracy, a dotyczą jedynie aspektów, które w mojej opinii zostały niewystarczająco uwzględnione i o których przedstawienie/przedyskutowanie proszę w czasie publicznej obrony dysertacji:

1. w prezentowanym podsumowaniu brakuje zestawienia najważniejszych konkluzji z publikacji tworzących cykl;
2. w prezentowanym podsumowaniu brakuje omówienia ograniczeń prowadzonych badań i dyskusji nad możliwością rozwiązania obserwowanych problemów w kolejnych badaniach; szczególnie istotne wydaje się być omówienie kwestii związanych z brakiem proliferacji oraz odróżnicowaniem chondrocytów, czy też komórek AD-MSCs poddanych chondrogennemu różnicowaniu w biodrukowanych 3D konstruktach w hodowli *in vitro*.

Podsumowując, recenzowana rozprawa doktorska składa się z cyklu powiązanych tematycznie publikacji o wysokiej wartości merytorycznej. Indywidualny udział Doktorantki w prace tworzące cykl nie budzi zastrzeżeń i stanowi potwierdzenie Jej ogromnej wiedzy i umiejętności samodzielnego prowadzenia prac naukowych. W mojej opinii rozprawa doktorska mgr Julii Anny Semby pt. „Zastosowanie biodruku 3D oraz opracowanie biotuszy na bazie hydrożeli i nanomateriałów dla inżynierii tkankowej łąkotki” w pełni spełnia wszelkie wymogi określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 poz. 547). Wnoszę więc do Wysockiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Julii Anny Semby do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto z uwagi na innowacyjność, oryginalność, jak również szeroki zakres metodyczny i aplikacyjny uzyskanych wyników składam wniosek o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Katedra Urologii i Andrologii

prof. dr hab. Marta Pokrywczyńska