

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr inż. Alicji Kosik- Kozioł,

Three-dimensional tissue scaffolds fabrication for Osteochondral Tissue Engineering

Uszkodzenie chrząstki stawowej jest częstą dolegliwością człowieka, która wymaga złożonych metod leczenia, a w stanach bardzo zaawansowanych, nawet wszczepienia endoprotezy. Niemniej jednak współczesna medycyna stosuje cały szereg procedur, prowadzących do leczenia zachowawczego chrząstki stawowej. Choroba ta jest szczególnie trudna do leczenia, ze względu na naturę tej tkanki (tkanka nieunaczyniona) i jej ograniczone możliwości regeneracyjne. Ubytki chrząstki leczy się różnymi metodami, takim jak artroskopowa technika operacyjną (microfracture), przeszczepami autogennymi, osoczem bogato- płytkowym (Platelets Rich Plasma) czy wreszcie metodami inżynierii tkankowej. Tej właśnie metodzie poświęcona jest rozprawa doktorska pani mgr inż. Alicji Kosik-Kozioł. Zatem tematykę pracy doktorskiej należy uznać, nie tylko za aktualną, ale również bardzo potrzebną, chociażby z uwagi na fakt, że choroby stawów dotyczą coraz liczniejszą populację ludzi na świecie, a stosowane metody nie zawsze prowadzą do pożądanego rezultatu.

Praca rozpoczyna się rozdziałem opisującym anatomie stawu, wraz z opisem tej jego części, która ma kluczowe znaczenie z punktu widzenia jego funkcjonalności, tj. złożonego układu kostno-chrząstecznego o wysokiej anizotropii struktury. Autorka opisuje precyzyjnie budowę wszystkich trzech składników tego układu tkanek tzn. chrząstkę szklistą, chrząstkę uwapnioną i kość pod-chrząsteczną. Omawia wszystkie składniki poszczególnych tkanek, budujących układ chrząsteczny- kostny, wraz z charakterystyką komórek, znajdujących się w każdej z tkanek. Rozdział zawiera również część kliniczną traktującą o chorobach stawów i metodach ich leczenia. Autorka przedstawia czynniki, związane z chorobami stawów oraz opisuje zmiany w tkankach o różnym stopniu zaawansowania. Rozdział ten zawiera również opis metod stosowanych w leczeniu ubytków tkanki chrząsteczej. Przedstawione są w nim metody leczenia chorób stawów, które w znaczący sposób mogą ograniczyć konieczność wszczepiania endoprotez stawowych. Rozdział pierwszy, oprócz części związanej z anatomią stawów, części klinicznej i opisem metod leczenia, zawiera szereg podstawowych informacji o głównych założeniach inżynierii tkanek, wraz i opisem metod wytwarzania podłoży tkankowych, materiałach stosowanych do ich produkcji. Autorka charakteryzuje również te specyficzne rozwiązania inżynierii

tkanek, które wynikają z budowy i właściwości układu kostno-chrzęstnego i przedstawia ideę podłoży jedno, dwu i trój- fazowych. Można zatem stwierdzić, że pierwszy rozdział pracy p. mgr inż. Alicji Kosik-Kozioł stanowi cenne kompendium wiedzy, związanej z anatomią i metodami leczenia tkanki osteochondralnej, zwłaszcza tych, które wywodzą się z inżynierii tkanek.

Jak wiadomo, inżynieria tkankowa, która liczy sobie już 30 lat, doczekała się niezwykle bogatej literatury, prezentującej różnego rodzaju rozwiązania dotyczące konstrukcji podłoży tkankowych, ich funkcjonalizacji, doboru komórek, bioaktywnych czynników, jak i wyników badań w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Jednak ogromna wiedza, jaka powstała w tej interdyscyplinarnej dziedzinie, w stosunkowo niewielkim stopniu, przekłada się na zastosowania kliniczne. Należy zgodzić się z Doktorantką, że zwłaszcza w leczeniu chrząstki, metoda ta napotyka na szereg trudności. Niemniej jednak rokowania co do oczekiwanych praktycznych rezultatów należy uznać za optymistyczne. Wynika to z rozwoju metod materiałowych, nowych rozwiązań w zakresie tworzenia układów biomimetycznych o pożądanych właściwościach biologicznych i mechanicznych, co w połączeniu z szeroką bazą biozgodnych surowców, zapewne doprowadzi do wytworzenia w pełni biofunkcyjnych konstruktów tkankowych.

Wnioski z rozdziału, dotyczącego przeglądu literatury pozostają w ścisłym związku z tezą pracy, którą stawia Doktorantka w której twierdzi, że zarówno nowoczesne techniki przyrostowe, a zwłaszcza metoda FDM, jak i trójfazowa konstrukcja podłoża tkankowego, to najistotniejsze elementy w poszukiwaniu skutecznych rozwiązań w leczeniu powierzchni stawowych. Praca doktorska p. mgr inż. Alicji Kosik-Kozioł ma na celu wykazanie przewagi trójfazowych podłoży, przeznaczonych do regeneracji układu kostno-chrzęstnego. Autorka postanowiła prowadzić badania w taki sposób, aby dla każdego rodzaju tkanki tworzącej powierzchnie stawową, opracować rusztowania tkankowe wykorzystując nowoczesne technologie materiałowe, kolejno dla tkanki chrzęstnej szklistej, chrząstki uwapnionej oraz dla tkanki kostnej, a następnie w oparciu o uzyskane w ten sposób doświadczenia, opracować produkt finalny, którym jest rusztowanie trójfazowe i wykazać jego potencjalne zalety, w porównaniu do rusztowania jednofazowego.

Praca p. mgr inż. Alicji Kosik-Kozioł ma nietypowy układ i odbiega znacząco od powszechnie przyjętych standardów w zakresie konstrukcji i układu prac doktorskich. Rozdziały, które następują po części literaturowej i po rozdziale, w którym została przedstawiona teza pracy, w zasadzie nie są rozdziałami, tylko publikacjami, nie są one kopiami artykułów (tak jak to wymaga ustawa) tylko nieco zmodyfikowanymi publikacjami w których zmieniono np. numeracje poszczególnych rozdziałów, brak jest tych części artykułów w której zawarta jest spis publikacji itp. Taki układ pracy należy uznać jednak za dość niefortunny w żaden sposób nie poprawiający czytelności czy jasności przekazu całego

opracowania. Wszystkie cztery rozdziały to wieloautorskie publikacje, które w ostatnich dwóch latach ukazały się w wysoko notowanych czasopismach z dziedziny inżynierii materiałów. W każdej z tych publikacji Doktorantka jest pierwszym autorem, chociaż nie dokumentuje, na czym polegał jej udział w badaniach, na podstawie których powstały artykuły. Należy zauważyć, że wszystkie te artykuły, tematycznie spójne w pełni odpowiadają założeniom pracy doktorskiej i przedstawiają wiedzę, związaną z zastosowaniami nowoczesnych narzędzi materiałowych, przeznaczonych do zastosowań medycznych w zakresie leczenia powierzchni stawowych. Artykuły mają podobny układ, charakterystyczny dla większości prac z dziedziny inżynierii biomateriałów, a mianowicie: posiadają część materiałową, w każdym przypadku zawierającą oryginalne rozwiązania metodyczne, związane z technikami przyrostowymi, następnie rozbudowane badania właściwości fizykochemicznych wytworzonych podłoży oraz w różnym stopniu rozwinięte badania in vitro.

Rozdział trzeci to publikacja, która ukazała się w *Journal Biofabrication* (2017) (IF=7.236) *PLA short sub-micron fibers reinforcement of 3D bioprinted alginate constructs for cartilage regeneration*, autorstwa; Alicja Kosik-Kozioł, Marco Costantini, Tomasz Bolek, Krisztina Szöke, Andrea Barbetta, Jan Brinchmann, Wojciech Świąszkowski. Artykuł prezentuje innowacyjną strategię zastosowaną do wzmacniania konstruktów hydrożelowych, przy zastosowaniu krótkich włókien PLA. Konstrukt powstał przy zastosowaniu druku 3D, w którym wykorzystano kompozytowe biotusze, zawierające włókna polilaktydowe. Zawarte w artykule wyniki właściwości mechanicznych, uzyskanych w ten sposób podłoży, w połączeniu z wynikami badań in vitro, jednoznacznie potwierdzają słuszność przyjętych założeń i wysoki potencjał aplikacyjny podłoży alginianowych z krótkim włóknem polimerowym do zastosowań w leczeniu ubytków tkanki chrzęstnej. Rozdział czwarty przedstawia sposoby leczenia chrząstki przy zastosowaniu podłoży hydrożelowych, modyfikowanych fosforanem wapnia. Kolejny artykuł zatytułowany; *3D Bioprinted hydrogel model incorporating β -tricalcium phosphate for calcified cartilage tissue engineering*, autorstwa; Alicja Kosik-Kozioł, Marco Costantini, Anna Mróz, Joanna Idaszek, Marcin Heljak, Jakub Jaroszewicz, Ewa Kijeńska, Krisztina Szöke, Nadine Frerker, Andrea Barbetta, Jan E. Brinchmann, Wojciech Świąszkowski ukazał się w czasopiśmie: *Journal Biofabrication* (2019), (IF=7,236). Badania in vitro zawarte w tej pracy dokumentują istotny wpływ TCP na proces różnicowania komórek BM-hMSCs. Zatem w obu publikacjach, które ukazały się w czasopiśmie *Journal Biofabrication* i dotyczyły badań nad podłożami o różnym składzie i odmiennej budowie udowodniono, że metody przyrostowe to atrakcyjny kierunek wytwarzania funkcjonalnych podłoży dla regeneracji chrząstki, a także, że stosując odpowiednią modyfikację materiału można sterować strukturą tworzącej się chrząstki.

W rozdziale 5 przedstawione zostały wyniki badań, dotyczące podłoża tkankowego, przeznaczonego do regeneracji tkanki kostnej, czyli trzeciego komponentu złożonej struktury

rusztowania dla tkanki kostno-chrzęstnej. Artykuł pt. *Surface modification of 3D printed polycaprolactone constructs via a solvent treatment: impact on physical and osteogenic properties* autorstwa; Alicja Kosik-Kozioł, Elizabeth Graham, Jakub Jaroszewicz, Adrian Chlanda, Sudheesh Kumar, Saso Ivanovski, Wojciech Świąszkowski, Cedryck Vaquette, ukazał się w *ACS Biomaterial Science & Engineering* (2019), (IF=4.511). W artykule tym autorzy przedstawili badania nad opracowaniem i wytworzeniem resorbowalnych podłoży tkankowych wytwarzanych z polikaprolaktamu w procesie FDM. Jak wiadomo PCL jest szeroko stosowanym w medycynie resorbowalnym polimerem, o stosunkowo długim procesie resorpcji, którego zasadniczą wadą, zwłaszcza w konstrukcji materiałów, przeznaczonych dla regeneracji tkanek jest to, że powierzchnia tego polimeru nie sprzyja adhezji komórek. Sprawia to, że dla zastosowań, takich jak opisane w artykule, konieczne jest stosowanie obróbki powierzchniowej, która prowadzi do zmian swobodnej energii powierzchniowej i jej składowych, jak również topografii powierzchni. Znanych jest wiele procedur modyfikowania powierzchni PCL, natomiast Autorzy wykorzystali oryginalne podejście do tego zagadnienia i w swojej pracy porównali grupę materiałów, poddanych obróbce rozpuszczalnikowej. W pracy tej Autorzy, przy użyciu wszelkich dostępnych metod, bardzo precyzyjnie przebadali powierzchnie modyfikowanych podłoży i otrzymali szereg interesujących wyników, dotyczących wpływu parametrów powierzchni na różnicowanie się komórek mezenchymalnych i adsorpcję białka.

Publikacja przedstawiona w rozdziale 6 to kluczowa pozycja z punktu widzenia weryfikacji tezy pracy, opisująca właściwości strukturalne i mechaniczne podłoży o biomimetycznej budowie, tzn. podłoży trójfazowych przeznaczonych do leczenia powierzchni stawowych. Publikacja pt. *Mechanical Properties of Hybrid Triphasic Scaffolds for Osteochondral Tissue Engineering*, autorstwa; Alicja Kosik-Kozioł, Marcin Heljak, Wojciech Świąszkowski, ukazała się w bieżącym roku w czasopiśmie *Journal Materials Letters* 261, (2020), (IF=3.019). Przedmiotem badań opisanych w tym artykule jest materiał składający się z trzech komponentów, z których każdy adresowany jest do poszczególnych warstw powierzchni stawowej; chrząstki szklistej, uwapnionej i tkanki kostnej podchrzęstnej. Artykuł ten powstał w oparciu o wiedzę jaką Autorzy zdobyli we wcześniejszych badaniach, w których opracowano podłoża dla każdego z elementów, wchodzących w skład układu kostno-chrzęstnego. W artykule zebrano wcześniejsze doświadczenia, uzyskane w badaniach pojedynczych podłoży tkankowych i w przejrzysty sposób opisano procedury stosowane w technologii przyrostowej dla każdego w poszczególnych elementach. Przedstawiono składy biotuszy stosowane w procesie drukowania dla każdego podłoża, które dodatkowo opisano w oparciu o czytelny układ graficzny. Jednak głównym celem tej pracy była rozbudowana analiza mechaniczna wszystkich badanych układów, jak i trójfazowego produktu finalnego. Wiadomo, że właściwości mechaniczne wszelkiego rodzaju implantów, powinny mieć charakter biomimetyczny, zwłaszcza w przypadku takich, które są

przeznaczone do regeneracji tkanki kostnej. Autorzy wyznaczyli moduły w warunkach ściskania, odkształcenia i naprężenia przy zniszczeniu wszystkich badanych elementów oraz przeprowadzili dynamiczną analizę mechaniczną podłoża trójfazowego. Wyniki uzyskane w badaniach mechanicznych doprowadziły do wyciągnięcia wniosków wskazujących na odpowiednie do tego rodzaju materiałów metody implantacji. Według Autorów artykułu, w badaniach in vivo powinno się wszczepiać tego rodzaju podłoża poniżej powierzchni natywnej tkanki, co z jednej strony zabezpieczy implant przed degradacją powierzchni, z drugiej zaś ułatwi integrację materiału z otaczającymi tkankami. Jednakże trzeba dodać, że zweryfikowanie tej tezy wymaga przeprowadzenia odpowiednich, potwierdzających badań in vivo.

Rozdział ostatni pracy doktorskiej pani mgr inż. Alicji Kosik-Kozioł to podsumowanie wszystkich wyników przedstawionych w czterech publikacjach. Doktorantka wskazuje na naukowe i aplikacyjne osiągnięcia swojego doktoratu oraz wskazuje drogi do dalszego ulepszania podłoży tkankowych, przeznaczonych dla tkanki osteochondralnej. W posumowaniu należy stwierdzić, że wyniki zamieszczone w publikacjach w pełni weryfikują postawioną tezę pracy i jednoznacznie wskazują, z jednej strony na możliwości jakie tkwią w różnego rodzaju rozwiązaniach metodycznych technologii przyrostowych, z drugiej zaś wskazują na szerokie możliwości związane z doбором surowców, które odpowiednio modyfikowane prowadzą do uzyskania materiałów o określonej aktywności biologicznej i biomimetycznych właściwościach fizycznych.

W posumowaniu należy stwierdzić, że zamieszczone w pracy publikacje stanowią spójny tematycznie zbiór, Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach (co zgodnie z przyjętymi w interdyscyplinarnych opracowaniach standardami, wskazuje na jej wiodącą rolę w przygotowaniu publikacji) komentarz, jaki Doktorantka zamieściła w swojej pracy wskazuje, że jest specjalistą w uprawianej przez siebie dziedzinie wiedzy, również nie ulega wątpliwości, że praca jej wnosi istotny przyczynek do wiedzy, związanej z wytwarzaniem materiałów medycznych w oparciu o techniki przerostowe. Recenzowana praca, spełnia wymogi Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym (Dz. U. z 2003. Nr 65 poz.595; z późn. zm.).

Wnoszę zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Materiałowa, Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Alicji Kosik-Kozioł do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

