

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, 9 października 2023

RECENZJA

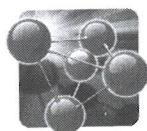
rozprawy doktorskiej mgr inż. Żanety GÓRECKIEJ
pt.

"Biodegradable composite materials for implantable fiducial markers"
zrealizowanej pod kierunkiem

Promotora Prof. dr. hab. inż. Wojciecha Świąszkowskiego
i Promotor pomocniczej Dr inż. Emilii Choińskiej

Recenzja została opracowana na podstawie uchwały
Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Materiałowa Politechniki
Warszawskiej i zlecenia Zastępcy Przewodniczącej Rady Naukowej
Dyscypliny Inżynieria Materiałowa
Prof. dr hab. inż. Anny Boczkowskiej
z dnia 4 sierpnia 2023

Leczenie guzów nowotworowych za pomocą metod chirurgicznych czy radioterapii wymaga opracowywania nowych narzędzi i wyrobów medycznych, które mogłyby ułatwić pracę chirurgowi, poprzez dokładne oznaczenie obszaru zmiany nowotworowej, aby w czasie zabiegu nie było wątpliwości czy cały guz został usunięty. Do tego celu można wykorzystać niewielkich wymiarów implanty, które przed właściwą operacją wprowadza się za pomocą technik małoinwazyjnych, aby zaznaczyć marginesy zmiany nowotworowej. W tym zakresie bardzo obiecujące jest projektowanie i wytwarzanie takich znaczników odniesienia (z ang. *fiducial markers*), które zawierają odpowiednie środki kontrastujące, ale również są biogodne, cechują się odpowiednimi właściwościami



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

mechanicznymi, tj. zbliżonymi do właściwości tkanek, do których będą implantowane.

Badania prowadzone przez panią mgr inż. Żanetę Górecką skupiające się na otrzymaniu kompozytów opartych o biodegradowalne polimery zmodyfikowane związkami kontrastującymi pozwalającymi na zastosowanie obrazowania za pomocą technik rentgenowskich i fluorescencji w bliskiej podczerwieni, doskonale wpisują się w ten trend. Dlatego uważam, że wybór tematyki rozprawy doktorskiej jest nowatorski, trafny i dobrze uzasadniony.

Rozprawa doktorska pani mgr inż. Żanety Góreckiej została zredagowana w języku angielskim, liczy 265 stron i została wydana w 2023 r. postaci monografii w ramach serii wydawniczej Politechniki Warszawskiej w dyscyplinie Inżynieria Materiałowa.

Na początku rozprawy znajduje się *Streszczenie* w języku angielskim i polskim, spis treści oraz *Wykaz skrótów*. Potem jest *Rozdział I – Wprowadzenie*, podzielony na 5 podrozdziałów, który w sumie zajmuje 49 stron. Następnie przedstawione zostały *Hipoteza, cele i zakres rozprawy doktorskiej* (4 strony). Dalsza część rozprawy to cztery kolejne rozdziały, w których doktorantka prezentuje wyniki swoich badań i poddaje je dyskusji. Rozdziały te mają formę typowych artykułów naukowych, a więc można w nich wyróżnić wprowadzenie literaturowe, opis materiałów i metod, analizę i dyskusję wyników, oraz podsumowanie, a niekiedy dodatkowe rysunki, opisy metod i wyników (tzw. *Supplementary files*). Podkreślenia wymaga, że trzy z omawianych rozdziałów zostały przygotowane na podstawie już opublikowanych prac, a jeden został przesłany do czasopisma. Tak więc część eksperymentalna rozprawy zajmuje 129 stron. Pracę kończy *Rozdział VII – Wnioski i perspektywy na przyszłość, Spis literatury* (317 pozycji), a także *Spis rysunków i tabel* oraz *Dorobek naukowy* kandydatki do stopnia doktora. Pracę cechuje bardzo dobra proporcja pomiędzy częścią literaturową i doświadczalną. Pod względem formalnym praca spełnia również wszystkie wymagania ustawowe.

We *Wstępie literaturowym* w rozdziale 1.1 autorka wprowadziła czytelnika w tematykę obrazowania z wykorzystaniem promieniowania rentgenowskiego i za pomocą fluorescencji w bliskiej podczerwieni nakreślając postawy fizyczne obu technik. Następnie w rozdziałach 1.2 i 1.3 opisała rodzaje, metody otrzymywania i właściwości znaczników odniesienia przeznaczonych do terapii i diagnostyki nowotworów, skupiając się najpierw na markerach do obrazowania rentgenowskiego. Nie mam wątpliwości, że przestudiowała w tym względzie dostępną aktualną literaturę o czym świadczy zestawienie przykładowych materiałów kontrastowych bazujących na polimerach zawarte w Tabeli 1.2. Podobne podejście doktorantka zastosowała w kolejnym podrozdziale, w którym zaprezentowała materiały do obrazowania za pomocą fluorescencji w bliskiej podczerwieni. Najpierw opisała dostępne fluorofory a dalej w Tabeli 1.4 materiały o właściwościach fluorescencyjnych i ich wykorzystanie biomedyczne. Kolejny podrozdział 1.4 dotyczył metod wytwarzania kompozytów o osnowie polimerowej, co również znajduje uzasadnienie z uwagi na tematykę pracy. Ostatni podrozdział 1.5 autorka poświęciła podsumowaniu części literaturowej, z którego wynika, że celowe jest prowadzenie badań nad materiałami, które nadawałyby się do obrazowania za pomocą obu omawianych technik, tj. promieniowania rentgenowskiego i fluorescencji w bliskiej podczerwieni. Moim zdaniem, *Wstęp literaturowy* jest bardzo dobrze napisany, choć czasami pojawiają się w nim pewne błędy edycyjne, takie jak niespójny sposób cytowania prac (czasami odnośniki literaturowe są umieszczane po ostatnim wyrazie w zdaniu bez spacji a potem jest kropka, czasami po kropce jest spacja i potem jest cytowanie, a czasami w ogóle nie ma kropek na końcu zdania, co szczególnie widać na str. 44 i 45). Ponadto na niektórych stronach pozostawiane jest dużo wolnego miejsca, np. na str. 22, 32, 33.

Wymienione drobne niedociągnięcia, w moim odczuciu, nie obniżają jednak wartości merytorycznej części literaturowej dysertacji doktorskiej pani mgr inż. Żanety Góreckiej.

Uważam, że przegląd literatury został bardzo dobrze zredagowany i świadczy o tym, że doktorantka porusza się ze swobodą w tematyce obejmującej rodzaje związków kontrastujących, techniki obrazowania a przede wszystkim projektowania i wytwarzania materiałów przeznaczonych do konkretnych zastosowań, a więc tematyki bardzo dobrze wpisującej się w inżynierię materiałową. Studiując część literaturową pracy nasunęło mi się pytanie do dyskusji w czasie publicznej obrony: Czy w przypadku wykorzystania markerów, które miałyby na celu jedynie oznaczenie obszaru zmiany nowotworowej, aby w czasie zabiegu chirurg nie miał wątpliwości czy cały guz został usunięty, wskazane byłoby ich usunięcie czy też pozostawienie ich w okolicy operowanego miejsca?

Cel główny pracy oraz cztery cele szczegółowe zostały właściwie sformułowane i nie mam do nich żadnych zastrzeżeń.

W części eksperymentalnej (*Rozdział III*) doktorantka najpierw wytworzyła cztery kompozyty na bazie poliestrów alifatycznych: polikaprolaktonu, kopolimeru laktydu i kaprolaktonu o dwóch udziałach molowych komonomerów 70:30 i 85:15 oraz kopolimeru laktydu z glikolidem o stosunku komonomerów 82:12 wzbogacone w submikronowe cząstki siarczanu baru i nanocząstki hydroksyapatytu (po 10% udziału każdego z modyfikatorów) a następnie scharakteryzowała ich właściwości w funkcji czasu degradacji w środowisku wodnym z wykorzystaniem m.in. takich technik badawczych jak: TGA, DSC, GPC, SEM, w celu wyselekcjonowania polimeru, który najbardziej nadawałby się na wytworzenie z nich znaczników odniesienia. Okazał się nim być kopolimer laktydu i kaprolaktonu o udziale molowych komonomerów 70:30. Rozdział ten przedstawia wyniki już opublikowane w 2022 r. w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (2022, 23.22, 14363), jest bardzo dobrze zredagowany i nie mam do niego żadnych zastrzeżeń merytorycznych. Chciałabym tylko dowiedzieć się dlaczego doktorantka użyła po 10% modyfikatorów każdego typu.

Czy przeprowadziła w tym celu jakieś wstępne badania i taki skład okazał się optymalny, czy też oparła swój wybór na doniesieniach literaturowych, a może miała tak dużo szczęścia i od razu udało jej się uzyskać materiały o tak korzystnych właściwościach?

W *Rozdziale IV* doktorantka zmodyfikowała za pomocą plazmy tlenowej i amoniaku powierzchnię kopolimeru laktydu i kaprolaktonu o udziale molowym komonomerów 70:30 oraz kompozytów o osnowie z tego polimeru zawierających 10% siarczanu baru i 20% hydroksyapatytu; procedury te miały na celu poprawę ich właściwości biologicznych. I tu nasuwa się pytanie: dlaczego zwiększono zawartość hydroksyapatytu do 20%, w porównaniu z zawartością opisaną w poprzednim rozdziale? Autorka najpierw scharakteryzowała właściwości powierzchni za pomocą spektroskopii fotoelektronów (XPS), oceniła zwilżalność metodą dynamiczną oraz topografię za pomocą mikroskopii sił atomowych. Badania wykazały, że powierzchnia zmodyfikowana plazmą w atmosferze amoniaku jest bardziej stabilna niż za pomocą modyfikacji plazmą tlenową. Badania cytozgodności w kontakcie bezpośrednim wykazały, że komórki L929 wykazują lepszą adhezję do powierzchni modyfikowanych w plazmie amoniaku, niż do powierzchni niemodyfikowanej. Nie doszukałam się jednak w tym rozdziale wyników badań komórkowych po modyfikacji plazmą tlenową. Czy doktorantka prowadziła takie badania, skoro scharakteryzowała właściwości fizykochemiczne takich próbek? W dalszej części pracy zostały przedstawione wyniki badań cytotoksyczności na wyciągach. Zastanawia mnie, czym kierowała się doktorantka dobierając wzajemny stosunek materiałów i modyfikatorów do objętości płynu ekstrakcyjnego, który wynosił albo 50 mg/ml albo 25 mg/ml i jak to ma się do rekomendacji zawartych w normie ISO 10993? Doktorantka stwierdziła na koniec, że zastosowana przez nią modyfikacja wpłynęła korzystnie na oddziaływanie komórek z materiałem a co za tym idzie postawiła hipotezę, że będzie miało to korzystny wpływ na integrację z tkankami. Czy doktorantka, już w czasie publicznej obrony,

mogłaby się wypowiedzieć jakie dalsze badania należałoby przeprowadzić aby potwierdzić powyższe stwierdzenie? Chciałabym podkreślić, że rozdział ten przedstawia wyniki już opublikowane w 2016 r. w czasopiśmie *Journal of Materials Chemistry B* (2016, 4.34, 5700-5712)

W Rozdziale V autorka opracowała innowacyjne biodegradowalne materiały typu rdzeń-otoczka, których rdzeń przygotowany metodą wytlaczania zbudowany był z kopolimeru laktydu i kaprolaktonu o udziale molowym komonomerów 70:30 i 20% udziale hydroksyapatytu oraz 10% siarczanu baru lub jodoheksolu. Otoczkę stanowił polimer o powyższym składzie wzbogacony o zieleń indocjaninową naniesiony na rdzeń metodą powlekania zanurzeniowego. W rozdziale tym przedstawiono wyniki z badań *ex vivo* i *in vivo*, potwierdzające że materiały markerowe mogą być wizualizowane za pomocą fluorescencji w bliskiej podczerwieni przez okres kilku dni od wszczepienia. W dłuższym okresie czasu przydane okazało się stosowanie technik rentgenowskich, gdyż rdzeń markerów był wzbogacony w siarczan baru lub jodoheksol. Rozdział ten dostarcza również innych ciekawych danych, gdyż zwierzęta eksperymentalne poddawane były naświetlaniu przy dawce i reżimie naświetlania takim jak w przypadku radioterapii u ludzi (6 razy po 5 Gy co tydzień), a następnie oceniano zarówno właściwości markera jak i tkanki go otaczające za pomocą metod histologicznych. Badania wykazały, że najkorzystniejsze właściwości wykazuje materiał zawierający hydroksyapatyt i jodoheksol. Wyniki przedstawione w Rozdziale V zostały opublikowane w 2022 r. w prestiżowym czasopiśmie *ASC Biomaterials Science & Engineering* (2022, 8.2, 859-870).

W Rozdziale VI doktorantka skupiła się na opracowaniu kompozytu opartego na polimerze z poprzedniego rozdziału, w którym jodoheksol oraz zieleń indocjaninowa były zaadsorbowane na nanocząstkach hydroksyapatytu a następnie wprowadzone do matrycy polimerowej, w której finalna zawartość jodoheksolu wynosiła 10% a hydroksyapatytu 20%. Ocenione zostały właściwości

kontrastowe, właściwości mechaniczne, stabilność i cytotoksyczność, które wykazały, że zastosowane podejście jest szczególnie skuteczne w kontekście równomiernego rozprowadzenia związków kontrastowych w matrycy i ich funkcjonalności w czasie kilkunastotygodniowej inkubacji w środowisku wodnym. Doktorantka badała uwalnianie jodoheksolu do środowiska wodnego (sól fizjologiczna buforowana fosforanami - PBS i surowica cielęca - FBS). Chciałabym prosić o komentarz już w czasie publicznej obrony, czy badane i analizowane przez doktorantkę uwalnianie jodoheksolu jest korzystne, czy wręcz przeciwnie, w kontekście zachowania właściwości kontrastowych przez jak najdłuższy czas, wymagany dla zapewnienia skuteczności np. terapii radiacyjnej?

Rozdział VII – *Wnioski* zawiera najważniejsze osiągnięcia opisane w dysertacji i nakreśla dalsze plany badawcze, co dowodzi, że doktorantka doskonale poradziła sobie z syntetycznym spojrzeniem na uzyskane przez siebie wyniki i potrafi wyciągnąć z nich właściwe, poparte doświadczeniem wnioski.

Chciałabym podkreślić, że dysertacja doktorska pani mgr inż. Żanety Góreckiej pt. *"Biodegradable composite materials for implantable fiducial markers"* spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w dyscyplinie inżynieria materiałowa w myśl Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 z późn. zm.), a także przepisami Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1669, z późn. zm.). Na wymienione niewielkie niedociągnięcia głównie natury edytorskiej, zwróciłam uwagę z racji pełnienia funkcji recenzentki, aby doktorantka nie powielala ich w przyszłości w kolejnych swoich pracach. Uwagi te nie umniejszają mojej wysokiej oceny merytorycznej recenzowanej pracy. Pozostałe uwagi i pytania są zaproszeniem do dyskusji naukowej w trakcie publicznej obrony.

Na podkreślenie zasługuje też, że opisane w rozprawie wyniki zostały już częściowo opublikowane w czasopismach o dużym współczynniku oddziaływania (*International Journal of Molecular Sciences*, *Journal of Materials Chemistry B*, *ASC Biomaterials Science & Engineering*), co oznacza, że już przeszły wnikliwy proces recenzji i zdobyły uznanie środowiska naukowego. Ostatni rozdział został przesłany do czasopisma *Journal of Biomedical Materials Research A*. We wszystkich tych artykułach doktorantka jest pierwszą autorką. Kandydatka do stopnia doktora jest współautorką w sumie 14 publikacji w czasopismach z bazy JCR (w tym w czterech występuje jako pierwsza autorka). Ponadto kieruje projektem NCN Preludium, pracowała w trzech projektach Strategmed, projekcie POIR i projekcie NCN oraz szeregu projektów uczelnianych. Jest współautorką patentu, odbyła też liczne zagraniczne i krajowe staże naukowe, prezentowała wyniki swoich badań na wielu konferencjach naukowych, uczestniczyła w szkoleniach i warsztatach. Pani mgr inż. Żaneta Górecka wykazuje się wyróżniającą aktywnością naukową i może pochwalić się bardzo dobrym dorobkiem, jak na ten etap rozwoju naukowego.

W związku z powyższym wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej oraz dopuszczenie pani mgr inż. Żanecie Góreckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto uważam, że praca doktorska: 1) jest bardzo bogata metodycznie, 2) stanowi przyczynek do poszerzenia wiedzy na temat metod otrzymywania kompozytów termoplastycznych wzbogaconych w środki kontrastowe; 3) dostarcza nowych i wartościowych informacji na temat projektowania innowacyjnych znaczników do obrazowania za pomocą technik rentgenowskich i fluorescencji w bliskiej podczerwieni; 4) wskazuje, że pozyskana wiedza może być zastosowana praktycznie co wykazano w testach *ex vivo* i *in vivo*; 5) prezentuje wyniki, z których większość została opublikowana a więc przeszła wnikliwy proces recenzji w renomowanych czasopismach,

a ponadto, 6) doktorantka ze swobodą wykorzystuje różnorodne narzędzia badawcze stosowane nie tylko w inżynierii materiałowej, ale również w naukach biologicznych. Biorąc powyższe pod uwagę uważam, że praca doktorska pani mgr inż. Żanety Góreckiej zasługuje na wyróżnienie.

