Wrocław, 14.09.2023 r.

dr hab. inż. Izabela Polowczyk, profesor uczelni
Katedra Inżynierii Procesowej i Technologii Materiałów
Polimerowych i Węglowych
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Piotra Kowalczyka

Recenzowana rozprawa doktorska pt.: „Proces otrzymywania polimerowo-ceramicznych granulatów porowatych do odbudowy tkanki kostnej" została wykonana pod opieką prof. dr hab. inż. Piotra Ciacha w renomowanym ośrodku badawczym jakim jest Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej. Promotorem pomocniczym rozprawy był dr inż. Michał Wojasiński. Zakład Biotechnologii i Inżynierii Bioprocesowej, którym kieruje Profesor Ciach, oraz w którym adiunktem jest Doktor Wojasiński, specjalizuje się, między innymi w badaniach nad nowatorskimi systemami dostarczania leków, redukcją inwazyjności sprzętu medycznego oraz medycyną regeneracyjną. Temat rozprawy doktorskiej wpisuje się zatem w ten ostatni nurt badań prowadzonych w macierzystej jednostce Doktoranta.

Badania nad opracowaniem procesów otrzymywania syntetycznych biomateriałów w formie granul oraz wytwarzania z nich rusztowań, jako potencjalnego podłoża wzrostu komórek i regeneracji tkanki kostnej (na przykład po usunięciu nowotworu) wydają się interesujące z punktu widzenia nie tylko rozważań teoretycznych, ale także prowadzą do wniosków mających zastosowanie praktyczne, m.in. w chirurgii stomatologicznej. Z tego względu uważam wybór tematu pracy doktorskiej jako w pełni uzasadniony.

Z przysłanego CV wiadomo, że Pan mgr inż. Piotr Kowalczyk w 2014 roku ukończył studia inżynierskie na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej na kierunku Biotechnologia. Studia magisterskie na tym samym wydziale i kierunku, na specjalności Applied Biotechnology ukończył w 2016 roku. W tym samym roku rozpoczął studia doktoranckie na Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej PW.

Rozprawa doktorska mgr inż. Piotra Kowalczyka została napisana w języku polskim i stanowi zbiór czterech publikacji naukowych, które zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR w latach 2020-2023. Prace ukazały się w następujących czasopismach: *Colloids and Surfaces B:* Biointerfaces (100 pkt MEiN), *International Journal of Molecular Sciences* (140 pkt MEiN) oraz *Biomaterials Advances* (dwie prace, 40 pkt MEiN). Sumaryczny IF tych prac wynosi 28,4. Są to publikacje wieloautorskie. W trzech pracach Doktorant jest pierwszym autorem i jednocześnie autorem korespondencyjnym. W oświadczeniach Doktoranta wprawdzie nie ma podanego procentowego udziału, ale wyraźnie jest określony jego wkład w powstanie każdej z publikacji z cyklu, zarówno pod kątem stworzenia koncepcji, jak i wykonania samych badań i przygotowania manuskryptu. Deklarowany udział Pana mgr inż. Piotra Kowalczyka polegał m.in. na wykonaniu przeglądu literatury, przygotowaniu części teoretycznej oraz opisaniu części doświadczalnej dotyczącej przygotowania granulatów oraz ich wykorzystania do wytwarzania trójwymiarowych rusztowań. Doktorant aktywnie uczestniczył również w przygotowaniu każdego manuskryptu i wykonaniu ilustracji. W dwóch pierwszych pracach Doktorant współuczestniczył w wykonaniu eksperymentów. W pierwszej pracy z cyklu zaproponował zastosowanie granulatu polimerowo-ceramicznego jako wypełnienia implantów tytanowych do

naprawy szczęki po resekcji nowotworu kości i opracował metodykę jego otrzymania oraz przygotował i scharakteryzował otrzymany materiał. W kolejnej pracy dokonał przeglądu literatury i napisał część wstępu teoretycznego dotyczącą materiałów wykorzystywanych do regeneracji tkanki kostnej. Współuczestniczył również w przygotowaniu granulatów chitozanowo-ceramicznych i wykonał badania dotyczące charakterystyki tego materiału oraz określił aktywność enzymu i stężenie białka po kilkutygodniowej hodowli komórek modelowych. W dwóch kolejnych publikacjach mgr inż. Piotr Kowalczyk wykonał prawie wszystkie badania i obliczenia, z pewnymi wyjątkami, gdy w badaniach uczestniczyli również inny badacze, co jest dokładne podane w oświadczeniach.

Oceniając całościowy dorobek naukowy Pana mgr inż. Piotra Kowalczyka mogę stwierdzić, że jest on znaczny jak na młodego naukowca. Oprócz 4 publikacji naukowych, które Doktorant wybrał do cyklu, jest on także współautorem 3 innych artykułów w czasopismach naukowych (*Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* oraz *Physica Medica*). Sumaryczny IF jego prac wynosi ponad 39. Indeks Hirscha Doktoranta wg bazy Scopus wynosi 3 na dzień przygotowania recenzji, z łączną liczbą 38 cytowań. Pan mgr inż. Piotr Kowalczyk do tej pory zaprezentował wyniki swoich badań w formie 3 wystąpień ustnych prezentowanych osobiście, był także współautorem 3 innych wystąpień ustnych oraz 6 posterów na konferencjach międzynarodowych i ogólnopolskich. Jeden plakat został wyróżniony nagrodą za najlepszy poster. Doktorant brał czynny udział w kilku konferencjach przeznaczonych dla młodych naukowców, takich jak *9th* i *11th European Young Engineers Conference* oraz *Doktoranckie Sympozjum Nanotechnologii NanoMat*. Doktorant uczestniczył w dwóch projektach badawczych. Brak jest informacji o stażach odbytych w kraju czy za granicą.

Przedmiotowa rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach dwóch projektów badawczych. Jeden z nich był finansowany z NCBiR w ramach projektu M-ERANET2, zaś drugi z POB Biotechnologia i Inżynieria Biomedyczna ze środków Politechniki Warszawskiej w ramach Programu Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza (IDUB).

Wydanie książkowe rozprawy doktorskiej obejmuje 159 stronach. Na pierwszych stronach można znaleźć streszczenie w języku polskim i angielskim, wraz ze słowami kluczowymi. A dalej listę publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz pozostały dorobek naukowy Doktoranta, wskaźniki bibliometryczne na dzień przygotowania tekstu oraz projekty, w ramach których zrealizowana była przedmiotowa rozprawa doktorska. Część merytoryczna rozprawy została podzielona na trzy logiczne części – „Wprowadzenie do tematyki badawczej", „Proces otrzymywania granul" oraz „Budowa rusztowań i badania biologiczne". Ta część zwieńczona jest omówieniem wyników w kontekście postawionych tez badawczych i dyskusją, co zajęło w sumie 63 strony opracowania. Rozprawa nie zwiera wniosków jako osobnego rozdziału. W celu ułatwienia czytelnikowi orientacji w dość licznych skrótach angielskich nazw użytych w opracowaniu, Autor zamieścił ich wykaz. Dodał także spis rysunków i tabel. Do opracowania dołączone zostały również pełne teksty publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej poprzedzone oświadczeniem Doktoranta, co do jego roli w powstawaniu publikacji z cyklu. Pomimo braku oświadczeń pozostałych współautorów, wkład mgr inż. Piotra Kowalczyka jest jednoznaczny. Niestety, z uwagi na mały format, zupełnie nieczytelne są załączone publikacje. Dzięki temu, że Doktorant zamieścił w opracowaniu adresy doi publikacji z cyklu, można było je pobrać. Ostatnią częścią rozprawy jest bibliografia.

Rozprawa doktorska mgr. inż. Piotra Kowalczyka ma charakter pracy typowo doświadczalnej z elementami statystycznego modelowania procesów. Przedmiotem rozprawy doktorskiej była próba

optymalizacji procesu wytwarzania syntetycznych biomateriałów w formie porowatych granul oraz wytwarzania z nich rusztowań, które mogą znaleźć zastosowanie jako podłoże do wzrostu komórek i odbudowy tkanki kostnej, w tym przypadku w aplikacjach chirurgii stomatologicznej. Doktorant skupił się przede wszystkim na zbadaniu wpływu parametrów procesowych na wybrane właściwości fizyczne otrzymanych materiałów. Dodatkowo przeprowadzone zostały badania *in vitro*, które miały na celu ocenę właściwości bioaktywnych otrzymanych rusztowań. Poniżej przedstawiam najważniejsze cele rozprawy doktorskiej oraz zakres badań.

1. Zaproponowanie i optymalizacja procesu wytwarzania porowatych granulatów o potencjalnym zastosowaniu w naprawie defektów tkanki kostnej lub w inżynierii tkankowej kości.

   Zaplanowano, że granulaty zostaną otrzymane z trzech rodzajów polimerów (poli(kwas mlekowy), kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego oraz polikaprolakton) oraz chitozanu. Dodatkowo, do polimerów dodany zostanie β-trifosforan wapnia (β-TCP), minerał chemicznie podobny do hydroksyapatytu, z którego zbudowane są kości. Zaadoptowany zostanie proces SIPS, tak aby możliwe było otrzymanie porowatych granulatów kompozytowych. W tym celu planowano przeanalizowanie wpływu wybranych parametrów procesowych, takich jak stężenie polimeru, stężenie TCP oraz stężenie surfaktantu, temperatura i intensywność mieszania, na właściwości otrzymanego granulatu. Ocenianymi właściwościami produktu były rozmiar cząstek i kulistość. Dodatkowo zaplanowano również analizę morfologii granulatów z wykorzystaniem techniki SEM oraz wstępną analizę biozgodności z komórkami tkanki kostnej. Pierwsza teza pracy, którą sformułował Doktorant, i którą ta część badań miała potwierdzić, brzmiała: Techniką SIPS można otrzymać porowate granulaty kompozytowe, które mogą być użyte jako elementy rusztowania tkankowego.

2. Zaproponowanie procesu termicznego łączenia granulatów w celu otrzymania rusztowania 3D do hodowli komórek ludzkich i zwierzęcych.

   Zaplanowano wytworzenie rusztowań z granulatu kompozytowego poprzez spiekanie. Badania właściwości mechanicznych rusztowań, ze szczególnym naciskiem na moduł sprężystości i wytrzymałość na ściskanie miały zweryfikować drugą tezę pracy: Właściwa obróbka termiczna sprawia, że granulat można wykorzystać do wytworzenia rusztowań tkankowych, które mogą następnie służyć do prowadzenia hodowli *in vitro* komórek zwierzęcych i ludzkich.

3. Określenie bioaktywności rusztowań wykonanych z granulatów kompozytowych.

   Aby ocenić bioaktywne właściwości otrzymanych rusztowań tkankowych zaplanowano wykorzystać w badaniach *in vitro* linie komórkowe ludzkiego raka kości oraz ludzkie komórki macierzyste. Dodatkowo postanowiono poprawić adhezję komórek na rusztowaniach poprzez zwiększenie hydrofilowości materiałów plazmą atmosferyczną lub nanoszenie polikatecholamin (polidopaminy i polinorepinefryny). Badania bioaktywności polegały na obserwacji komórek z użyciem skaningowej laserowej mikroskopii konfokalnej, pomiarach ilości wytworzonego białka i aktywności enzymu fosfatazy alkalicznej, jak również ocenie mineralizacji kostnej za pomocą barwienia czerwienią alizarynową. Ten cykl badań pozwolił na weryfikację trzeciej tezy pracy: Rusztowania tkankowe wykonane z granulatu kompozytowego posiadają potencjał bioaktywny.

W części I rozprawy zatytułowanej „Wprowadzenie do tematyki badawczej" Doktorant pokrótce podaje skład tkanki kostnej i rodzaje kości oraz omawia proces osteogenezy i regeneracji tkanki

kostnej. Następnie przechodzi do zagadnienia trójwymiarowych rusztowań umożliwiających wypełnienie ubytków przestrzennych w tkance. Wymienia właściwości, jakie musi posiadać syntetyczne rusztowanie kostne, wskazując na porowatość i rozmiar porów, jako najważniejsze dla wzrostu komórek parametry biomateriału. W dalszej kolejności opisuje klasy stosowanych jako rusztowania biomateriałów, czyli kości pochodzenia ludzkiego lub odzwierzęcego, a także materiały syntetyczne. Dalej Doktorant opisuje różne sposoby wytwarzania rusztowań syntetycznych oraz rodzaje materiałów stosowanych w tym celu, wskazując ich wady i zalety. Podsumowując dokonany przegląd literatury w tematyce badawczej, Doktorant stwierdza, że „wciąż konieczne jest znalezienie materiałów, które można wytwarzać w kontrolowany i wydajny sposób, które pozwolą na wytworzenie rusztowań o odpowiednich właściwościach". Jednocześnie wskazuje na porowaty powierzchniowo granulat o określonym zakresie rozmiaru granul, którego struktura dająca tzw. otwartą porowatość potencjalnie nadaje się do takich zastosowań, zarówno w formie sypkiej, jak i spieku do rusztowania trójwymiarowego. Jak dowodzi Doktorant, struktura mikroporowata jest w takim materiale pożądana, ponieważ zwiększa powierzchnię właściwą granulatu, co sprzyja adhezji komórek. Jedną z metod generowania mikroporowatości w materiałach polimerowych jest proces SIPS, z ang. *solvent-induced phase separation*, czyli rozdzielenie faz wywołane rozpuszczalnikiem. I tą właśnie metodę postanowił Doktorant zaadoptować do wytwarzania syntetycznego biomateriału polimerowo-ceramicznego w formie granul, z których następnie jest sporządzane rusztowanie.

W dwu kolejnych częściach rozprawy doktorskiej pt.: „Proces otrzymywania granul" oraz „Budowa rusztowań i badania biologiczne", Doktorant pokrótce przedstawił wyniki swoich badań, które zostały opublikowane w publikacjach z cyklu. Bardzo dobrze oceniam sposób przedstawienia wyników w opracowaniu. Doktorant nie omawia po kolei publikacji, ale skupia się na głównych celach pracy jako całości i przedstawia wyniki tak, aby można było śledzić tok badań – od próby doboru optymalnych parametrów procesu SIPS, przez wytworzenie i charakterystykę porowatego granulatu i wstępną ocenę jego biozgodności, aż do doboru warunków temperaturowych dla wytworzenia rusztowań tkankowych z granulatu i wreszcie do określenia ich bioaktywności.

W części II rozprawy doktorskiej Doktorant najpierw opisuje wykorzystane materiały i metodykę badawczą, a następnie przechodzi do przedstawienia otrzymanych wyników i podsumowania. W tej części dokładnie została opisana metodyka SIPS otrzymywania poliestrowych porowatych granulatów. Opisano również metodykę otrzymywania granulatu kompozytowego z wykorzystaniem chitozanu, β-trifosforanu wapnia i ludzkiej kości techniką enkapsulacji. Dalej Doktorant opisał dobór warunków mieszania układu emulsyjnego w procesie SIPS (proszę Doktoranta, aby w czasie obrony odniósł się do kwestii doboru czasu mieszania – pytanie zawarte poniżej w uwagach do dyskusji na obronie pracy doktorskiej) oraz dobór surfaktantu (mój komentarz odnośnie nazewnictwa i doprecyzowania, jaki emulgator/dyspergator ostatecznie został użyty – również poniżej). Dalej Doktorant prezentuje zdjęcia SEM powierzchni i przekroju granulek otrzymanych bez i z użyciem porogenu. Ważnym elementem rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Piotra Kowalczyka jest modelowanie procesu otrzymywania granulatu techniką SIPS. W tym celu Doktorant korzystając z programy Statistica wygenerował plan badawczy, przyjmując jako zmienne niezależne stężenie polimeru, stężenie β-TCP, stężenie surfaktantu, szybkość mieszania i temperaturę (prośba o doprecyzowanie sposobu obliczania wspomnianych stężeń oraz wybranych poziomów zmiennych niezależnych). Otrzymane produkty scharakteryzowano z wykorzystaniem dwóch zmiennych zależnych: średniego rozmiaru i kulistości cząstki (uwagi odnośnie doboru tych parametrów zamieszczono poniżej). Wyniki eksperymentów zrealizowanych zgodnie z planem badawczym przeanalizowano z wykorzystaniem programu Statistica.

Zbudowano statystyczne modele opisujące przewidywany średni rozmiar i kulistość powstającej w procesie granuli. Zaobserwowane wartości zmiennych zależnych zostały porównane z przewidywanymi wartościami tych zmiennych za pomocą wielomianu drugiego stopnia. Uzyskane modele okazały się niezbyt dobrze dopasowane. Pomimo tego, obserwacje otrzymanych dla różnych wartości zmiennych wejściowych granulatów pozwalają na wyciągnięcie pewnych wniosków, co do wpływu poszczególnych zmiennych na średni rozmiar i kulistość granulatów. Wyniki analizy statystycznej Doktorant podsumował stwierdzeniem o istnieniu złożonych, synergistycznych efektów między badanymi zmiennymi niezależnymi i zaleca uwzględnienie wszystkich tych zmiennych podczas planowania wytwarzania kompozytów tkankowych metodą SIPS. Według opinii recenzenta, warto rozważyć przetestowanie innych poziomów zmiennych niezależnych oraz ewentualnych innych parametrów, takich jak lepkość, co sugeruje również Doktorant, czy czas mieszania, co może przyczynić się do bardziej owocnej analizy statystycznej. Doktorant pisze, że mimo, że zaproponowane modele statystyczne oparte na danych z zaprojektowanego planu eksperymentalnego nie są w stanie dokładnie przewidzieć rozmiaru i kształtu uzyskanego granulatu, to jednak wskazują parametry, które są istotne dla przygotowywania granulatów, jako materiału na rusztowania tkankowe. A także, że można tak dobrać kombinację parametrów, aby otrzymać kuliste granulaty o rozmiarach cząstek zawierających się w wybranym przedziale, które mogą posłużyć do wytwarzania rusztowań odpowiednich do wzrostu komórek kostnych (proszę o wyjaśnienie stosowanego w pracy optymalnego zakresu wielkości granul – uwaga poniżej). Najlepszą wg Doktoranta kombinacją parametrów jest: 5% polimeru, 20% β-TCP, 1% surfaktantu, 150 obr./min i 30 °C. W dalszej części opracowania Doktorant przedstawia wyniki mikrotomografii komputerowej otrzymanych granulatów, gdzie porównano próbki z dodatkiem i bez dodatku β-TCP. Obserwacje potwierdzają, że granulaty posiadają zarówno porowatość wewnętrzną, jak i zewnętrzną. Następnie wybrane warianty granulatów zbadano pod kątem cytotoksyczności według normy ISO 10993-5. Jak wykazały badania, żaden z granulatów nie wywołał spadku żywotności komórek mysich fibroblastów poniżej 70 % w ekstraktach pozyskanych po 24-godzinnym kontakcie, co wg normy oznacza brak cytotoksyczności. Potwierdza to również, w opinii Doktoranta, że rozpuszczalniki organiczne oraz surfaktant zostały skutecznie odmyte z granulatu. Udowodniony brak cytotoksyczności pozwolił na wykorzystanie granulatów do wytworzenia rusztowań i rozwinięcie badań biologicznych.

Część III przedmiotowej rozprawy doktorskiej została poświęcona wytwarzaniu rusztowań i badaniom biologicznym. Doktorant najpierw opisuje prace nad doborem odpowiedniej temperatury do spiekania granulatów, tak aby zachować odpowiednią porowatość. Z otrzymanych metodą SIPS granulatów polimerowo-ceramicznych na bazie czterech rodzajów biomedycznych polimerów przygotowano rusztowania. W tym celu granulaty będące mieszaniną polimerów i β-TCP zostały poddane formowaniu w walce. Nagrzewano je do temperatury powyżej temperatury zeszklenia, ale poniżej temperatury topnienia danego polimeru. Doświadczalnie dobrane temperatury wynosiły odpowiednio: 170 °C dla PLA i PLGA oraz 60 °C dla PCL. Umieszczone w szklanym cylindrze i zmiękczone temperaturą granule uległy połączeniu w rusztowanie, bez przykładania dodatkowej siły, tak aby zachować mikroporowatość granul. Ponieważ wstępne badania biologiczne wykazały trudności w adhezji hydrofilowych komórek, postanowiono zmodyfikować rusztowania, zmieniając ich zwilżalność, za której miarę przyjęto kąt zwilżania (pytanie dotyczące metodyki wyznaczania kąta zwilżania zamieszczono poniżej). Zastosowano trzy techniki modyfikacji powierzchni rusztowań i granulatów polimerowo-ceramicznych: plazmę atmosferyczną oraz pokrycia z polikatecholamin (polidopaminy i polinorepinefryny). Jak wyjaśnia Doktorant, skuteczność pokrycia polikatecholaminami zostały

udowodniona badaniami FTIR. Badania obrazowaniu SEM i mikrotomografii komputerowej rusztowań z różnych kompozytów polimerowych przed i po modyfikacji potwierdziły zachowanie struktur mikroporowatości po formowaniu termicznym. Modyfikowane i niemodyfikowane rusztowania poddano testom na cytotoksyczność pośrednią i wyszły one negatywnie. W dalszej kolejności zostały omówione wyniki badań biologicznych tych rusztowań pod kątem hodowli *in vitro* komórek unieśmiertelnionego ludzkiego raka kości linii MG-63, która jest często wykorzystywana jako linia modelowa wzrostu komórek kostnych. Obserwację komórek wzrastających na rusztowaniach kompozytowych prowadzono techniką konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej po wybarwieniu komórek zielonym i niebieskim barwnikiem fluorescencyjnym. Skany rusztowań udowodniły dużo lepsza adhezję komórek do rusztowań modyfikowanych plazmą atmosferyczną i polikatecholaminami. Kolejnym krokiem były badania wzrostu komórek macierzystych. Obserwacje wzrostu komórek macierzystych prowadzono tak samo, jak dla komórek raka kości. Wysiane na rusztowaniach z Resomeru LR 706S i Biomeru L9000 oraz ich kompozytów z β-TCP komórki nie przyczepiły się do ich powierzchni. Dopiero modyfikacja polidopaminą polepszyła adhezję. Kolejnym krokiem była ocena aktywności enzymatycznej fosfatazy alkalicznej ALP, którą uznaje się za marker osteogenezy. Jednak otrzymane wyniki obserwowanego wzrostu aktywności mają duże odchylenia standardowe, i jak napisał Doktorant, należy podchodzić do nich z dużą ostrożnością. W badaniach biologicznych posłużono się również metodą wybarwiania z czerwienią alizarynową, barwnikiem, który jest używany do wykrywania procesów osteogenezy w preparatach histologicznych i kulturach *in vitro*, w których zaczynają powstawać złogi wapniowe. Doktorant wyjaśnia fałszywie pozytywny wynik wybarwienia również dla kontroli (proszę o uszczegółowienie tego uzasadnienia w trakcie obrony). Jednoczenie wymieniając technikę qRT-PCR zbadania mineralizacji osteoidu, którą zastosował, jednak bez większego sukcesu z uwagi na małą ilość materiału genetycznego.

Część merytoryczna pracy kończy się podsumowaniem i dyskusją wyników. Doktorant szczegółowo i krytycznie analizuje otrzymane wyniki w aspekcie sformułowanych na początku tez badawczych. Za sukces tej rozprawy doktorskiej Autor uznaje zaadoptowanie metody SIPS, stosowanej do otrzymywania mikrosfer polimerowych, czyli obiektów mniejszych niż granulat kompozytowy, który stanowił materiał do wytworzenia rusztowań tkankowych. Zastosowanie porogenu zapewniło odpowiednią mikroporowatość granulatu, która jest korzystna dla wzrostu komórek. To potwierdza pierwszą tezę badawczą. Doktorant sugeruje, że w dalszych pracach należałoby uwzględnić również pomiary rozwinięcia powierzchni właściwej, z czym trudno się nie zgodzić. W badaniach wpływu procesowych zmiennych niezależnych na średni rozmiar i kulistość granulatów okazało się, że utrudniona jest kontrola nad rozmiarem cząstek, a uzyskane modele nie są dobrze dopasowane. W modelach uwzględniono wszystkie zmienne niezależne, a usunięcie nieistotnych członów z modelu i pozostawienie jedynie tych związanych ze stężeniem polimeru i trifosforanu wapnia znacząco obniżało wartość R^2. Według Doktoranta zatem nie można pominąć żadnego z badanych parametrów przy określaniu średnicy i kulistości granulatów kompozytowych. Nie do końca mogę się z tym zgodzić, zwłaszcza, że sam Doktorant sugeruje, że możliwe, że należało uwzględnić lepkość zawiesiny polimeru i β-TCP jako zmienną niezależną. Jednak od razu zastrzega, że plan eksperymentu układał pod kątem łatwości w wyznaczaniu parametrów, a na pewno stężenie jest łatwiejsze do obliczenia niż lepkość do zmierzenia, z czym również trudno się nie zgodzić. Chociaż argument, że pomiary lepkich roztworów wymagają skomplikowanych technik i zaawansowanego sprzętu, jakoś mnie nie przekonuje. Pomimo, że analiza statystyczna okazała się zawodna, to jednak na podstawie uzyskanych wyników możliwe było dobranie takiej kombinacji parametrów, aby otrzymać granulat o pożądanej charakterystyce. Jak

napisał sam Doktorant, parametrami granulatu uważanymi za najbardziej pożądane w uzupełnianiu ubytków kostnych i dentystycznych są monodyspersyjność rozmiaru uzyskanego granulatu, duża kulistość oraz znacząca porowatość (zarówno na powierzchni, wewnątrz granulatów, jak i objętościowa porowatość między upakowanymi granulami). Proszę Doktoranta o odniesienie się do kwestii szerokości rozkładu wielkości i ewentualnego uwzględnienia wskaźnika polidyspersyjności jako zmiennej zależnej. Autor porównuje rusztowania otrzymane z kompozytowego granulatu wytworzonego metodą SIPS z innymi tkankowymi rusztowaniami polimer-ceramika, m.in. z otrzymywanymi techniką druku 3D metodą SLS rusztowaniach oraz granulowanymi ksenograftami. Otrzymany w tej pracy granulat może być śmiało wykorzystany zarówno jako granulat, jak i w formie spiekanych rusztowań, zwłaszcza, że odpowiednio dobrana temperatura nie niszczy mikroporowatości. Doktorant uważa, że można rozwinąć badania nad tworzeniem rusztowań metodą spiekania i przeprowadzić bardziej szczegółowe badania zachowania granulatu w różnych temperaturach, co jest jak najbardziej zrozumiałe. Uzyskanie wytrzymałości na ściskanie podobne kości gąbczastej, przy jednocześnie prostym przygotowaniem rusztowania, zdaniem Doktoranta, otwiera przed porowatymi granulatami polimerowo-ceramicznymi możliwość zastosowania do przygotowania spersonalizowanych implantów ubytków kości (uwaga dotycząca pomiarów wytrzymałości granulatu i rusztowań zamieszczona poniżej). Wstępne badania biologiczne wykluczyły cytotoksyczność otrzymywanych materiałów, co potwierdza drugą tezę badawczą. Jak się okazało, ograniczoną adhezję komórek do rusztowań można zintensyfikować poprzez modyfikację właściwości powierzchniowych na przykład plazmą lub nanoszeniem polikatecholamin. Zaproponowane modyfikacje okazały się sprzyjać wzrostowi komórek macierzystych. Jednak co do wyników badań aktywności enzymatycznej i białka, Autor wypowiada się z dużą rezerwą, z uwagi na duże odchylenia standardowe. Również, według Doktorant, dalszych badań wymaga potwierdzenie różnicowania osteoblastycznego, powstawania i mineralizacji osteoidu, gdyż otrzymane wyniki barwienia depozytów wapniowych są pozytywne, lecz niejednoznaczne. Niemniej jednak trzecia teza badawcza może zostać uznana za potwierdzoną, ponieważ rusztowania z granulatu posiadają potencjał bioaktywny.

Można zatem stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska potwierdziła wszystkie postawione tezy i przedstawia proces projektowania, otrzymywania i badania *in vitro* biomateriału do regeneracji tkanki kostnej.

Umieszczona na końcu bibliografia wykorzystana w przygotowaniu rozprawy doktorskiej to 170 starannie dobranych pozycji literaturowych. Warto zaznaczyć, że te publikacje były wykorzystane wyłącznie w przewodniku po publikacjach z cyklu. Jednakże każda z opisanych publikacji ma swoją własną bibliografię. Dobór pozycji literaturowych i sam przegląd literatury, jaki został przedstawiony w rozprawie doktorskiej, świadczą o wysokim poziomie wiedzy i umiejętności Pana mgr inż. Piotra Kowalczyka z zakresu omawianych zagadnień.

Autor pracy doktorskiej musi umiejętnie sformułować tezy badawcze, właściwie dobrać materiał badawczy oraz zastosować odpowiednie metody pozwalające uzyskać wyniki, które potwierdzą lub obalą postawione tezy. Chciałabym wyraźnie podkreślić, że Pan mgr inż. Piotr Kowalczyk realizując swoją pracę doktorską, doskonale opanował nowoczesne i wymagające narzędzia badawcze. Wybrane techniki były w większości przypadków trafne i skutkowały osiągnięciem celów pracy. Doktorant dobrze poradził sobie również z trudnym zadaniem poprawnej interpretacji uzyskanych wyników.

Praca doktorska została starannie przygotowana pod względem edytorskim, choć Autorowi nie udało się uniknąć pewnych błędów. Są to jednak drobne usterki, które nie wpływają negatywnie na ogólną ocenę pracy. Poniżej kilka przykładów:

- W spisie treści (str. 7) podane jest, że wskaźniki bibliometryczne podane są na dzień 14.06.2023, z kolei w treści pracy na stronie 11 podana jest data 21.06.2023. Zapewne nie zmieniły się one znacznie w przeciągu jednego tygodnia, jest to jednak pewna niespójność danych.
- Str. 15 – użyto słowa „blaski" zamiast „blaszki" międzysystemowe.
- Na str. 41 opracowania podano informację, że polimeru PLA Biomer Biopolyesters L9000 użyto do wytworzenia porowatego granulatu metodą SIPS w publikacji P1. Podczas gdy wykorzystano go również w P3. Oraz napisano, że PLA Evonik Industries Resomer LR 706 S użyto w P1, P3 i P4, podczas gdy nie wykorzystywano go w P1.
- Str. 52 – napisano „właścjwości materiałów" zamiast „właściwości materiałów".
- Str. 58 – zwrot: „Zaobserwowano również obecność dużo silniej porowatej struktury powierzchniowej" jest dość niezgrabny.
- Zaburzony szyk zdania (str. 73): „Należy jednak zaznaczyć, że dla dwóch różnych polimerów PLA niemożliwe było wspólnego znalezienie parametru o najmniejszym efekcie standaryzowanym, co utrudnia odrzucanie parametrów w celu uproszczenia modelu".
- Wielokrotnie w rozprawie pomylono zmienne zależne z niezależnymi, np. w zdaniu (str. 73): „Dwa rodzaje PLA zostały wykorzystane w planach badawczych mających zidentyfikować wpływ zmiennych zależnych na parametry kluczowe w procesie otrzymywanie granulatu (...)", na str. 53: „Otrzymane materiały zostały przeanalizowane pod kątem dwóch zmiennych niezależnych – średniego rozmiaru cząstki oraz średniej kulistości cząstek". I jeszcze kilku miejscach: str. 44 „Do utworzenia planu wybrano następujące zmienne zależne", str. 45 „Produkt procesu scharakteryzowano z wykorzystaniem dwóch zmiennych niezależnych: rozmiaru i kulistości cząstki.", „Tabela 3. Zmienne zależne w planie badawczym otrzymywania granulatów metodą SIPS", str. 46 „Dla pięciu zmiennych zależnych i dwóch zmiennych niezależnych został wybrany plan mieszany 2/3 poziomowy (...)".

W trakcie czytania rozprawy doktorskiej i publikacji z cyklu pojawiły się pewne pytania i wątpliwości. Poniższe uwagi są prowadzone w duchu dyskusji naukowej i nie mają na celu podważania wartości merytorycznej prezentowanej pracy doktorskiej. Proszę, aby Doktorant odniósł się do moich uwag podczas publicznej obrony rozprawy. Dodatkowo, publikacje wybrane do cyklu przeszły proces recenzji, skoro ukazały się, więc nie jest moim celem podważanie opinii recenzentów swoimi uwagami.

- W aspekcie wyznaczania tzw. średniego rozmiaru i kulistości granul, proszę podać w jaki sposób wyznaczono średni rozmiar z otrzymanych ze wzoru 1 (publikacja P3) d^{EQPC}? Dlaczego nie użyto mediany średnicy, która jest jednak bardziej odporna na wartości skrajne?
- Jak zdefiniowana w opracowaniu wzorem 1 kulistość (*circularity*) ma się do sferyczności (*sphericity*) liczonej ze wzoru $S = 2\sqrt{\pi A}/_{P}$ z artykułu Li i Iskander (2020) przywoływanego w rozprawie [152] oraz w P3 [31]?
- Dlaczego nie uwzględniono na przykład czasu mieszania jako zmiennej niezależnej? Doktorant napisał (str. 42): „W przypadku rozpatrywanego procesu SIPS mieszanie powinno odbywać się przez czas przynajmniej kilkunastu godzin, co umożliwi odparowanie dostatecznej ilości rozpuszczalnika by doszło do utworzenia stabilnej sfery z polimeru." – skąd taki wniosek i co dokładnie oznacza „stabilna sfera"? Z kolei w publikacji P3 można znaleźć: "The suspension was mixed for 6 h. After

this time, the organic solvents evaporated, and solid polymer composite spheres were obtained." – jak dobrany był ten czas?

- Proszę o wyjaśnienie, w jaki sposób liczone były stężenia polimeru, ceramiki i surfaktantu. Czy odnosiły się do mieszaniny polimeru i TCP w rozpuszczalnikach organicznych, czy do całości dyspersji łącznie z fazą wodną zawierającą surfaktant? Jaka ilość rozpuszczalnika organicznego była użyta do rozpuszczenia polimeru i zdyspergowania TCP i jakiej ilości wodnego roztworu surfaktantu użyto do przygotowania emulsji? Nie jest to jasne.
- Jak wynika z publikacji i opracowania, SDS okazał się nieodpowiednim emulgatorem w procesie wytwarzania granul. Proszę zatem o informację, jaki był dokładnie skład roztworu surfaktantu używanego w procesie SIPS. Nie do końca również zgadzam się z nazywaniem PVA surfaktantem, na równi z SDS.
- Czy dane w Tabeli 3 i Tabeli 4 opracowania dotyczące poziomów zmiennych niezależnych i planu badawczego dla procesu SIPS są zgodne z Tabelą 1 i Tabelą S1 w publikacji P3?
- Nie znalazłam informacji o rozkładzie wielkości cząstek stosowanego β-trifosforanu wapnia. Ta informacja wydaje się istotna, jako że był on dodawany do matrycy polimerowej i miał wpływ na jakość otrzymanego granulatu kompozytowego.
- W artykule P3 (str. 4) napisano: „Data of granulate size, circularity, and PDI for each variant from the experimental plan (Table S1) was transferred to Statistica 12 software and processed with the Design of Experiments analysis suite. Mean size, mean particle circularity, and PDI were treated as dependent variables for each investigated process variant." Proszę o wyjaśnienie, czy Doktorant planował uwzględnić również (jako ważny parametr materiału sypkiego, czyli otrzymanych porowatych granul), polidyspersyjność rozkładu wielkości cząstek? Czy taki parametr nie byłby istotny z punktu widzenia porowatości otwartej?
- W publikacji P3 można znaleźć: "The granulate for cellular growth and implantation should exhibit 0.5–0.8 mm diameter for optimal size of pores in the packing and inducing more intense osteogenesis [23], high ceramic content, high porosity, and low polydispersity. (...) Abels et al. confirmed that synthetic hydroxyapatite granules in the 0.5–2 mm size range caused the lowest inflammatory response in vivo compared to smaller ones [48]." Z jakiej publikacji w rozprawie doktorskiej (str. 37) podano, że: „Korzystną strukturą do takich zastosowań wydaje się porowaty powierzchniowo granulat o rozmiarach granul w zakresie 300 do 800 μm."?
- W aspekcie wyznaczania kąta zwilżania wodą materiału na rusztowania, to czy przygotowane w tym celu 1 mm warstwy kompozytowe nie ulegały deformacji w trakcie suszenia? W jaki sposób wyznaczany był kąt zwilżania na porowatych warstwach? Nie podano metodyki. Wydaje się, że wartościowe byłoby podjęcie prób wyznaczenia kąta zwilżania dla granulatu lub gotowych rusztowań lub chociaż zdolności chłonięcia wody metodą wzniesienia kapilarnego. Wyznaczenie kąta zwilżania powierzchni przez różne ciecze pozwoliłoby na obliczenie swobodnej energii powierzchniowej i skorelowanie jej ze stopniem adhezji komórek do nośnika. Czy w tym przypadku chodzi jedynie o graniczny kąt zwilżania, powyżej którego nie zachodzi adhezja komórek hydrofilowych?
- Doktorant wyjaśnia fałszywie pozytywny wynik wybarwiania czerwienią alizarynową również pustych rusztowań, jako wynik oddziaływania z polidopaminą lub też z wapniem pochodzącym z rozpuszczającego się β-TCP (str. 75). Czy można prosić o bardziej szczegółowe wyjaśnienia?
- Brakuje w opracowaniu przedstawienia badań wytrzymałości mechanicznej otrzymanych rusztowań, które były przecież wykonane (publikacja P3). Czy Doktorant uznał je za mało istotne? Czy badano wytrzymałość granulatów przed wytworzeniem rusztowań, skoro materiał mógłby być

potencjalnie używany również w formie nieuformowanej w rusztowanie, wydaje się to wskazane? Czy wyznaczano gęstość usypową granul?

- Czy planowane jest wyznaczanie potencjału elektrokinetycznego dzeta granulatów? Poniekąd wiadomo, że parametr ten jest istotny dla materiałów implantacyjnych.
- Doktorant w dwóch pracach ma dwie afiliacje. Proszę o wyjaśnienie, czy było to związane z realizacją projektu badawczego?

Uwagi i komentarze, które przedstawiłam powyżej, mają charakter dyskusyjny i nie mają na celu podważenia wartości merytorycznej przedmiotowej rozprawy doktorskiej, ani nie kwestionują mojej pozytywnej opinii o niej. Uważam, że Doktorant z powodzeniem zrealizował założone cele, jednocześnie potwierdzając sformułowane tezy badawcze, a uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w poszerzenie wiedzy na temat otrzymywania i wykorzystania syntetycznych biomateriałów jako podłoża do wzrostu komórek i odbudowy tkanki kostnej.

Rozprawa doktorska ma na celu przedstawienie oryginalnych badań oraz udokumentowanie zdolności kandydata do samodzielnego prowadzenia badań naukowych w danej dyscyplinie. W moim mniemaniu rozprawa mgr inż. Piotra Kowalczyka osiągnęła ten cel.

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że rozprawa mgr inż. Piotra Kowalczyka spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późniejszymi zmianami) i niniejszym wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów procedury postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych, dyscyplina inżynieria chemiczna.

Izabela Polowczyk