

Dr hab. n. med. Jacek Drobnik, prof. UM
Zakład Patofizjologii
Katedra Patologii Ogólnej i Doświadczalnej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Ul. Żeligowskiego 7/9
90-750 Łódź

Łódź, 19 maja, 2025 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej,
autorstwa Pani mgr Pauliny Katarzyny Rusek-Wala pt: "Angiogenne i
proregeneracyjne właściwości cholesterolu oraz osteogenne działanie
biokompozytu modyfikowanego cholesterolem". Praca wykonana pod
kierunkiem Pani dr hab. Agnieszki Krupy prof. UŁ oraz promotora
pomocniczego Pana dr hab. Przemysława Płocińskiego, prof. UŁ. Praca
realizowana była w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej Wydziału
Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Łódzkiego .**

Złamanie kości prowadzi do uruchomienia procesów regeneracji odpowiedzialnych za odtworzenie jej struktury i właściwości biomechanicznych. Regeneracja złamań kości obejmuje aktywację wielu czynników miejscowych i ogólnoustrojowych. Obok procesów powstawania chrząstki i jej kostnienia przebiega równolegle intensywna angiogeneza odpowiedzialna za odtworzenie unaczynienia miejsca złamania. Wzrost liczby naczyń krwionośnych wiąże się ze zwiększeniem przepływu krwi przez kallus. Proces ten jest bardzo istotny dla prawidłowego rozwoju fazy anabolicznej regeneracji. Kontynuacja angiogenezy obserwowana jest również podczas zastępowania tkanki chrzęstnej tkanką kostną. Dopiero w końcowym okresie regeneracji na skutek przebudowy naczyń krwionośnych obserwuje się zmniejszenie przepływu krwi w miejscu złamania. Procesy te podlegają regulacji przez zjawiska miejscowe (zapalenie) i ogólnoustrojowe. W swojej rozprawie, Pani mgr Paulina

Katarzyna Rusek-Wała podejmuje się konstrukcji biomateriału przydatnego do uzupełniania ubytków kostnych dotyczących zwłaszcza złamań, w których odtworzenie kości jest upośledzone. Złamania takie stanowią nawet 10% ogólnej liczby przypadków. Skonstruowany kompozyt będzie nie tylko pokrywał miejsce ubytku, ale jednocześnie dzięki zawartości cholesterolu pobudzał angiogenezę oraz procesy regeneracji.

Doktorantka jest współautorką 5 prac oryginalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach rangi międzynarodowej. Całkowity IF = 26.956 oraz 700 punktów MNiSW. Dorobek doktorantki jest bardzo wysoki. Dyżertacja ma charakter monografii i jest efektem realizacji projektu "Wielofunkcyjne kompozyty aktywne biologicznie do zastosowań w medycynie regeneracyjnej układu kostnego" (POIR.04.04.00-00-16D7/18) przeprowadzonego w ramach programu TEAM-NET Fundacji na rzecz Nauki Polskiej i dotowanego z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Unia Europejska). Ponadto, wyniki doktoratu są przedmiotem zgłoszenia patentowego pt. "Porowate kompozyty polimerowo-ceramiczne modyfikowane cholesterolem do zastosowania do wypełnień i regeneracji tkanki kostnej oraz sposób otrzymywania porowatych kompozytów polimerowo-ceramicznych modyfikowanych cholesterolem" (zgłoszenie nr P.447908, z dnia 1.03.2024).

Dyżertacja obejmuje 135 stron i składa się ze streszczeń w języku polskim i angielskim, wstępu (28 stron), rozdziału Materiały i Metody (23 strony), Wyników (40 stron), Dyskusji (14 stron), Podsumowania Wyników (1 strona), Wniosków (1 strona) oraz literatury (167 pozycji). Struktura i układ pracy są prawidłowe. Należy podkreślić że rozprawa zawiera bogate liczące 167 pozycji piśmiennictwo. Dominują publikacje anglojęzyczne. Większość prac opublikowana była po roku 2000. Prace cytowane są prawidłowo, a ich tematyka jest zbieżna z tematem doktoratu.

Złamania kości są istotnym problemem dla polskiej medycyny regeneracyjnej. Dane epidemiologiczne z 2022 r. wskazują na liczbę 146 tys złamań w Polsce w większości związanych z osteoporozą. Koszty ich leczenia sięgają prawie 800 mln złotych/rocznie. Obszar badań wybrany przez Doktorantkę jest aktualny i stanowi odpowiedź na wyzwania współczesnej medycyny w Polsce.

Cel pracy przedstawiony jest jasno i klarownie. Poprzedzony on jest prezentacją trzech hipotez badawczych. Zakładają one wpływ steroli na regenerację śródbłónka naczyniowego, podatność kompozytu polilaktydowego z dodatkiem włókien apatytowych do modyfikacji wybranym steroidem oraz pozytywny wpływ tak uzyskanego materiału na regenerację komórek kostnych i śródbłonkowych. Głównym celem dyzertacji jest wyselekcjonowanie sterolu o najefektywniejszym wpływie na regenerację naczyń, biologiczna, fizykochemiczna charakterystyka kompozytu polilaktydowego z dodatkiem włókien apatytowych, a następnie jego modyfikacja wybranym steroidem. W końcowej części pracy planowana jest ocena bezpieczeństwa i efektywności otrzymanego biomateriału. Tak sformułowany cel pozwala zaliczyć rozprawę jako interdyscyplinarną ponieważ jej tematyka obejmuje nie tylko medycynę regeneracyjną, biologię regeneracji złamań ale również fizykę i chemię biomateriałów.

Ocena zastosowanych metod badawczych. Należy zaznaczyć, że metody stosowane przez Doktorantę były bardzo zróżnicowane i obejmowały nie tylko procedury in vitro ale również in vivo. Taki układ eksperymentalny pozwalał na sprawdzenie efektów uzyskanych na hodowlach komórkowych, na modelu całego organizmu, zwiększając tym wartość i wiarygodność otrzymanych wyników. Prace in vitro przeprowadzono na różnych modelach komórkowych, mysich, szczurzych i ludzkich, adherentnych i nieadherentnych - zapewniając

prawidłowe warunki hodowlane i otrzymując poprawne wyniki. W badaniach zastosowano szeroką gamę nowoczesnych i wiarygodnych metod. Fakt ten świadczy o dużych umiejętnościach laboratoryjnych Autorki dyzertacji. W badaniach stosowano metody oceny aktywności metabolicznej komórek (MTT), migracji (test gojenia rany), badania ekspresji receptorów typu 2 dla VEGF, zawartości kolagenu (test immunoenzymatyczny), określenie stresu oksydacyjnego, oceniano tworzenie tubul przez komórki śródbłónka. Na uwagę zasługują metody molekularne pozwalające na określenie zmian transkryptycznych zachodzących w komórkach pozwalające przybliżyć mechanizm działania badanego sterolu na komórki śródbłónka. W eksperymentach przeprowadzonych na zwierzętach badane były bezpieczeństwo stosowania otrzymanego biokompozytu oraz jego bioefektywność. Doktoranta uczestniczyła w procedurach badań na zwierzętach dzięki otrzymanemu wyznaczeniu do pracy na zwierzętach nr 268W/2021. W części metodycznej przedstawiono ogólny zarys stosowanych obliczeń statystycznych. Dokładne informacje statystyczne opisane były pod wykresami w rozdziale Wyniki.

1. W ocenie możliwego działania cytotoksycznego badanych steroli w rozprawie użyto test MTT. Jakie inne testy określające cytotoksyczność mogą również zostać zastosowane i na czym polega zasada ich przeprowadzania?
2. Badane kompozyty przed eksperymentem zostały poddane sterylizacji radiacyjnej (str 62 i 65). Proszę Autorkę rozprawy o przedyskutowanie problemu czy taki sposób sterylizacji może zmienić strukturę biomateriału? Czy chemiczna sterylizacja (mimo jej wad) mogłaby stanowić lepsze rozwiązanie?
3. Celem oceny ekspresji receptorów typu 2 na powierzchni komórki zastosowano 0.2% roztwór Triton X 100 celem rozszczelnienia komórek. Jak wpłynął ten etap procedury na interpretację otrzymanych wyników.

Ocena omówienia wyników badań. Wyniki zostały zaprezentowane w rozdziale Wyniki, a następnie przedyskutowane w części Dyskusja. W tej części rozprawa zawiera klarowne wykresy z podpisami i szczegółowymi wyjaśnieniami, zdjęcia biomateriałów oraz wydruki z aparatury badawczej. Omawiane rozdziały są zaprezentowane w bardzo uporządkowany logiczny i klarowny sposób. Wnioski sformułowane są prawidłowo. Jednakże proponuję aby w podpisach pod rycinami precyzyjniej określić zależności statystyczne, wskazując konkretne grupy między którymi wyliczono różnice.

Rozprawa ma bardzo ważny aspekt praktyczny. Rezultatem badań jest stworzenie kompozytu PLA z dodatkiem włókien apatytowych i modyfikacja ich cholesterolem. Jest on przeznaczony do leczenia ubytków kostnych u pacjentów ze złamaniami. Istotnym problemem, rozwiązany w wyniku przeprowadzonych badań, jest wyselekcjonowanie cholesterolu z pośród innych badanych steroli jako czynnika korzystnie wpływającego na angiogenezę (promowanie regeneracji śródbłónka i tworzenia tubul przez komórki śródbłónka). Cholesterol jest skutecznie używany do modyfikacji kompozytu. Ponadto otrzymany kompozyt może być zasiedlany przez osteoblasty.

W pracy nie stwierdziłem żadnych istotnych nieprawidłowości. Z obowiązku recenzenta chciałbym wskazać nieliczne błędy o charakterze edytorskim lub językowym: nieujednolicony zapis skrótu TNF α (str 19) lub TNF α (str 30), proponuję unikać wyrazów obcojęzycznych np: remodelowanie (str 22), reagent (str 57) oraz sformułowań nieprawidłowych, takich jak powielane w niektórych publikacjach wyrażenie, "tkanka płucna". Wskazane drobne błędy nie umniejszają mojej wysokiej oceny rozprawy.

Rozprawa doktorska jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego. Jest to praca o dużym poziomie nowatorstwa i potencjalnie istotnym wpływie na rozwój dyscypliny

naukowej. Autorka przedstawiła dowody naukowe korzystnego wpływu cholesterolu jako składnika kompozytu PLA z dodatkiem włókien apatytowych i wykazała przydatność otrzymanego biomateriału do zaopatrzenia ubytków kostnych. Najbardziej nowatorską częścią pracy są badania transkryptomiczne, które pokazują mechanizm wpływu cholesterolu na komórki śródbłónka.

Ze względu na wysoką jakość badań, walory aplikacyjne oraz innowacyjność wnioskuję o wyróżnienie rozprawy. Praca doktorska przygotowana przez Panią mgr Rusek-Wałę dowodzi dojrzałości naukowej Autorki, zdolności do logicznego myślenia, prawidłowego formułowania wniosków, posiadania dużej wiedzy teoretycznej oraz wskazuje na duże doświadczenie w posługiwaniu się różnymi technikami eksperymentalnymi.

Wstęp do pracy jest wyczerpującym opisem procesów zapalenia i regeneracji śródbłónka, zastosowania kompozytów biologicznie aktywnych w regeneracji oraz dyskutuje rolę steroli w procesie regeneracji. Proszę Autorkę rozprawy o zaprezentowanie swojej opinii dotyczącej regulacyjnej roli zapalenia w procesie regeneracji kości.

Podsumowanie i opinia końcowa.

Rozprawa doktorska autorstwa Pani mgr Pauliny Katarzyny Rusek-Wałę jest interdyscyplinarną monografią o dużym stopniu nowatorstwa. Praca ta jest oryginalnym rozwiązaniem problemu badawczego. Techniki badawcze stosowane przez Autorkę są wiarygodne i nowoczesne. Przedłożona do oceny praca doktorska spełnia warunki stawiane pracom doktorskim w Ustawie art. 187, ust. 1-2 z dnia 20 lipca 2020 r. - Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. 2022, poz.574). Uprzejmie proszę Komisję Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Katarzyny Rusek-Wałę do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Jacek Drobniak