



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I KOMPOZYTÓW

Prof. dr hab. inż. Elżbieta PAMUŁA

Kraków, 8 czerwca 2025

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Katarzyny Rusek-Wali
pt. *„Angiogenne i proregeneracyjne właściwości cholesterolu oraz
osteogenne działanie biokompozytu modyfikowanego cholesterolem”*
zrealizowanej pod kierunkiem
Promotor dr hab. Agnieszki Krupy, prof. UŁ, oraz
Promotora pomocniczego dr. hab. Przemysława Płocińskiego, prof. UŁ

Recenzja została opracowana na podstawie decyzji
Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych
w dyscyplinie nauki biologiczne
podjętej na posiedzeniu w dniu 12 marca 2025
oraz zlecenia Przewodniczącej powyższej Komisji
Prof. dr hab. Agnieszki Marczał

W ostatnich latach prowadzi się coraz więcej badań w obszarze wspierania odbudowy uszkodzonej tkanki kostnej. Opracowuje się w tym celu implanty, które mają za zadanie pełnić funkcję nie tylko podporową ale i wspierać procesy naprawcze tkanek. Trudno sobie wyobrazić regenerację tkanki kostnej bez właściwego jej unaczynienia. Stąd wszelkie zabiegi mające na celu wspieranie angiogenezy są jak najbardziej uzasadnione.

W kontekście powyższych przesłanek pani mgr Paulina Rusek-Wala w ramach swojej pracy doktorskiej podjęła się wykazania wpływu różnych steroli, w tym cholesterolu na regenerację tkanki kostnej i wspieranie angiogenezy. Następnie postawiła tezę, że cholesterol wykazuje potencjał regeneracyjny wobec komórek



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

śródbłonka naczyniowego i że można wykorzystać go w charakterze modyfikatora kompozytów przeznaczonych na implanty kostne a wykonanych z polimeru degradowalnego i włókien hydroksyapatytowych,. Doktorantka założyła, że taki materiał wykazuje potencjał w zakresie wspierania regeneracji komórek kostnych i śródbłonkowych.

Aby zweryfikować postawioną tezę pani mgr Paulina Rusek-Wala zrealizowała szereg prac eksperymentalnych mających na celu: (1) wyselekcjonowanie sterolu o największym potencjale w zakresie regeneracji naczyń krwionośnych, (2) otrzymanie i scharakteryzowanie kompozytów jako nośnika takiego sterolu, (3) zbadanie bezpieczeństwa i efektywności biologicznej opracowanych materiałów w warunkach *in vitro* i *in vivo*.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że wybór tematyki rozprawy doktorskiej jest trafny, aktualny i bardzo dobrze uzasadniony.

Praca doktorska pani mgr Pauliny Rusek-Wali liczy 135 stron i jest zredagowana w języku polskim. Na początku pracy zamieszczono listę pięciu publikacji i tytuł zgłoszenia patentowego doktorantki. Następnie znajduje się streszczenie w języku polskim i abstrakt w języku angielskim oraz wykaz skrótów, który bardzo ułatwia lekturę czytelnikowi. Rozdział 1 – wstęp literaturowy zajmuje 21 stron, następnie w krótkich rozdziałach 2, 3 i 4 doktorantka uzasadniła podjęcie tematyki obejmującej jej rozprawę doktorską, po czym przedstawiła trzy hipotezy badawcze i cele pracy doktorskiej. Rozdział 5, zajmujący 23 strony, opisuje zastosowane materiały, odczynniki, klinie komórkowe, kompozyty a także metody badawcze stosowane w celu oceny właściwości biologicznych opracowanych kompozytów. Wyniki badań zestawiono i omówiono na kolejnych 40 stronach w rozdziale 6, ich dyskusja, podsumowanie i wnioski końcowe znalazły się odpowiednio w rozdziałach 7 (13 stron), 8 (1 strona) i 9 (1 strona). Pracę kończy spis 167 pozycji literaturowych, które zostały właściwie dobrane.

Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich, a pracę cechuje bardzo dobra proporcja między częścią literaturową a doświadczalną.

W rozdziale 1 doktorantka bardzo skrupulatnie zreferowała zagadnienia dotyczące stanu zapalnego śródbłónka naczyniowego, opisała jakie zmiany pojawiają się w uszkodzonych komórkach śródbłónka na poziomie transkryptomu, jakie szlaki biochemiczne są uruchamiane oraz jak następnie przebiega regeneracja śródbłónka. Następnie opisała materiały kompozytowe, które wykazują aktywność biologiczną w procesach regeneracyjnych opierając się na wielu źródłach literaturowych. Dużo miejsca poświęciła sterolom jako czynnikom o potencjale regeneracyjnym i stwierdziła, że biorąc pod uwagę pewne doniesienia literaturowe, szczególnie cholesterol może mieć wpływ na rozwój naczyń krwionośnych w zależności od dawki i czasu hodowli, co wykazano na modelu embrionu kurzego. Chciałabym podkreślić, że rozdział ten został przygotowany bardzo skrupulatnie, w oparciu o odpowiednią, najnowszą literaturę, został ponadto wzbogacony w czytelne ilustracje, które doskonale obrazują wywody doktorantki. Świadczy to o bardzo dobrym rozeznaniu autorki w referowanej tematyce. Uważam więc, że przegląd literatury został właściwie zredagowany a omawiane w nim zagadnienia są w pełni uzasadnione tematyką doktoratu. Doszukałam się w tym rozdziale tylko kilku błędów nomenklaturowych, które podaję z obowiązku powierzenia mi funkcji recenzenta. W publikacjach naukowych, a taką publikacją jest przecież rozprawa doktorska, powinno unikać się potocznych wyrażen takich jak „materiał plastikowy” (str. 36) – powinno być „materiał polimerowy”. Nie jest też użyta prawidłowa nomenklatura odnośnie materiałów polimerowych – na tej samej stronie napisano „kwas poliglikolowy” a powinno być „poli(kwas glikolowy)”.

W Rozdziale 2 doktorantka właściwie uzasadniła podjęcie tematu, w rozdziale 3 przedstawia trzy hipotezy badawcze a w rozdziale 4 pięć celów szczegółowych swojej rozprawy doktorskiej. W mojej opinii zagadnienia te zostały właściwie sformułowane i nie mam do nich zastrzeżeń.

W rozdziale 5 bardzo skrupulatnie opisano wszystkie używane odczynniki z podaniem ich pochodzenia, linie komórkowe, wykorzystane sprzęty, oprogramowanie a także zastosowane metody hodowli komórek i badań np. adhezji, proliferacji i różnicowania a także badań na modelu szczurzym. Pewien niedosyt odczuwam jedynie w zakresie opisu metody syntezy i metod badań włókien hydroksyapatytowych i ich modyfikacji za pomoc cholesterolu oraz wytwarzania kompozytów. Odnośnie badań materiału kompozytowego bardzo lakonicznie napisano, że zastosowano metodę FTIR, SEM i XRD, ale nie podano ani nazwy urządzeń ani warunków, w jakich te pomiary zostały wykonane. Podobna uwaga odnosi się do analizy termicznej.

W Rozdziale 6 opisano wyniki badań, najpierw dotyczące wpływu różnych steroli na komórki śródbłónka naczyniowego HMEC-1, które wykazały, że stymulacja cholesterollem była tak samo skuteczna jak stymulacja VEGF. Komórki takie wykazywały największą żywotność i cechowała je największa ekspresja receptora VEGFR2. Okazało się, że cholesterol nie powodował istotnego wzrostu poziomu stresu oksydacyjnego w komórkach śródbłónka ale – co jest bardzo korzystne – wspierał organizowanie się ich w tubule. Doktorantka potwierdziła też właściwości angiogenne cholesterolu w teście *ex vivo* oceniając kiełkowanie komórek śródbłónka naczyniowego z aorty szczurzej. Następnie przeszła do badań transkryptomu, które wykazały, że nadekspresji ulegają geny kodujące białka związane z migracją, proliferacją i angiogenezą, natomiast inhibicji pewne geny związane ze stanem zapalnym i apoptozą. Za bardzo ciekawe uważam badania ekspresji genów przez komórki HMEC-1 w obecności LPS *Helicobacter pylori*, prowadzone w warunkach kontrolnych, które wykazały wyraźną inhibicję genów zaangażowanych w procesy angiogenezy, ale dodatek cholesterolu miał wyraźne działanie protekcyjne. Biorąc powyższe wyniki pod uwagę doktorantka postanowiła wybrać cholesterol do modyfikacji kompozytów wykonanych z włókien hydroksyapatytowych i osnowy polilaktydowej.

Następnie doktorantka przedstawiła jak wyglądały włókna hydroksyapatytowe pod skaningowym mikroskopem elektronowym, zbadała ich skład fazowy za pomocą dyfraktometrii rentgenowskiej,

co wykazało, że składają się one w ok 71% hydroksyapatytu, 13,5% pirofosforanu wapnia i ok 15,5% β -TCP.

Potem doktorantka przeszła do opisu wyników testu formowania tubul przez komórki HMEC-1 i stwierdziła, że komórki w obecności włókien hydroksyapatytowych zorganizowały się w tubule, podczas gdy dla kontroli nie stwierdzono tego zjawiska. Czy doktorantka mogłaby dokładnie opisać jak wyglądał eksperyment tworzenia tubul przez komórki HMEC-1 w obecności włókien hydroksyapatytowych? Czy komórki miały kontakt z włóknami poprzez z Geltrex™, czy też część z włókien była wyeksponowana na powierzchni. Stężenie włókien hydroksyapatytowych 2 mg/ml wydaje mi się być bardzo duże, tak więc czy ich obecność nie przeszkadzała w obserwacjach mikroskopowych? Czy doktorantka zastanawiała się dlaczego obecność włókien hydroksyapatytowych stymuluje organizowanie się komórek śródbłonna w tubule? Czy mogą na to wpływać właściwości mechaniczne podłoża Geltrex™ – włókna hydroksyapatytowe?

Dalej doktorantka badała włókna hydroksyapatytowe zmodyfikowane cholesterolem i wykazała skuteczność modyfikacji za pomocą spektroskopii w podczerwieni FTIR i analizy termogravimetrycznej. Następnie przedstawiła wyniki badań mikrostrukturalnych i wytrzymałości na ściskanie kompozytów o osnowie poliaktydowej zawierających włókna hydroksyapatytowe niemodyfikowane i modyfikowane cholesterolem. Potem przeszła do zreferowania wyników w kontakcie z komórkami L929 i hFOB 1.19. Zastanawia mnie trochę metodologia przeprowadzenia badań cytotoksyczności w kontakcie z tymi komórkami, ponieważ doktorantka opisuje, że wykonywała badania w płytkach 96-dołkowych umieszczając na monowarstwie komórek kompozyty o powierzchni równej 1/10 powierzchni dołka. Biorąc pod uwagę jego średnicę równą 6,5 mm, te kompozyty powinny mieć poniżej 2 mm średnicy. Musiało to być bardzo trudne technicznie do wykonania. Czy te kompozyty utrzymywały się na dnie dołka, czy też pływały w pożywce hodowlanej? Bardzo proszę o komentarz w czasie publicznej obrony.

Przechodząc do kolejnych badań chciałabym dowiedzieć się jaka była wielkość próbek kompozytów, na których hodowano

komórki hFOB 1.19? Czy utrzymywały się one na dnie dołka i nie wypływały na powierzchnię? Pytanie moje wynika z dotychczasowego doświadczenia w zakresie badań *in vitro* porowatych rusztowań polimerowych, które są z natury hydrofobowe, ich pory są wypełnione powietrzem, które samoczynnie nie ulega usunięciu po umieszczeniu w pożywce. No chyba, że wykona się procedurę usuwania powietrza z porów i wypełniania ich pożywką. Wyniki badań uzyskane przez doktorantkę wskazują na bardzo słabą adhezję komórek na rusztowaniach kompozytowych, gdyż liczba komórek po 7 dniach była 10-krotnie niższa niż osadzonych 1 dnia. Może to wynikać albo ze złej kondycji komórek albo budowy próbek, która nie sprzyja ich adhezji. Czy doktorantka hodowała komórki w dołku hodowanym w warunkach kontrolnych, tylko w pożywce, bez żadnych kompozytów? Próbkę taką pozwoliłyby na wyciągnięcie wiarygodnych wniosków dotyczących żywotności komórek, wydzielania przez nie IL-6 czy ALP. Dlatego stwierdzenie doktorantki o proregeneracyjnym i prokościotwórczym potencjale badanego kompozytu uważam za nieco za daleko idące. Tym bardziej, że komórki śródbłonki naczyniowej HMEC-1, jak pisze doktorantka, „nie zasiedlały kompozytów” co należy odczytać, że po prostu obumierały w kontakcie z kompozytem. Doceniam pomysł doktorantki, aby pokryć kompozyty kolagenem, który dostarcza ligandów dla integrin i wspiera adhezję komórek. Jednak to nie pomogło, więc przyczyna może być inna. Czy doktorantka mogłaby się zastanowić i w czasie publicznej obrony rozważyć jakie mogły być przyczyny niskiej żywotności komórek hodowanych na kompozytach i ewentualnie jak należałoby zaprojektować eksperyment *in vitro* w przyszłości? Ostatni etap badań to była ocena *in vivo* na modelu szczurzym, gdy badany kompozyt wszczepiano zarówno w tkankę podskórną jak i w ubytek tkanki kostnej czaszki. W tym przypadku kompozyty zawierające cholesterol jak i jego niezawierające okazały się biozgodne, a te pierwsze wydawały się wspierać unaczynienie i proces mineralizacji.

W rozdziale 7 doktorantka przedyskutowała uzyskane wyniki i odniosła się do doniesień literaturowych, co oceniam bardzo dobrze. W rozdziale 8 i 9 podsumowała uzyskane wyniki i wyciągnęła wnioski. Wykazała tym samym, że założone cele pracy zostały osiągnięte.

Uważam, że plan badawczy doktoratu został właściwie przemyślany i zrealizowany. Doktorantka przeprowadziła imponującą liczbę badań, zaprezentowała i przedyskutowała uzyskane wyniki w sposób właściwy dla prac naukowych oraz wyciągnęła wnioski poparte wynikami przeprowadzonych przez nią eksperymentów. Praca jest też przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim. Pytania jakie stawiam w recenzji wynikają z mojej ciekawości i są zaproszeniem doktorantki do dyskusji naukowej w czasie publicznej obrony.

Podsumowując, chciałabym podkreślić, że praca doktorska mgr Pauliny Rusek-Wali pt. *„Angiogenne i proregeneracyjne właściwości cholesterolu oraz osteogenne działanie biokompozytu modyfikowanego cholesterolem”* stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje wiedzę teoretyczną doktorantki w dyscyplinie nauki biologiczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Tym samym spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2021 r. poz. 478).

Dlatego wnoszę o dopuszczenie pani mgr Pauliny Rusek-Wali do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.